



Atty. Dkt. No. 065691-0222

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED

OCT 02 2003

TECH CENTER 1600/2900

OIPE

Applicant: Pierre Chambon et al.  
Title: TRANSGENIC MOUSE FOR  
TARGETED RECOMBINATION  
MEDIATED BY MODIFIED CRE-ER  
Appl. No.: 09/853,033  
Filing Date: 05/11/2001  
Examiner: Celine X. QIAN  
Art Unit: 1636

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Commissioner for Patents  
PO Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

In support of this claim, filed herewith is a certified copy of said original foreign application:

- French Patent Application No. 0012570 filed October 3, 2000.

Respectfully submitted,

Date

Aug. 25, 2003

By

Stephen B. Maebius

FOLEY & LARDNER  
Washington Harbour  
3000 K Street, N.W., Suite 500  
Washington, D.C. 20007-5143  
Telephone: (202) 672-5569  
Facsimile: (202) 672-5399

Stephen B. Maebius  
Attorney for Applicant  
Registration No. 35,264



100-100000  
100-100000  
100-100000  
100-100000



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 AOUT 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planché', enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr





**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 190600

REMISE DES PIÈCES

Réserve à l'INPI

DATE **3 OCT 2000**

LIEU **75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

**0012570**

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

**03 OCT. 2000**

**Vos références pour ce dossier**

(facultatif) **238632 D18961 PM**

**1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**Cabinet REGIMBEAU  
Conseils en Propriété Industrielle  
20 Rue de Chazelles  
75847 PARIS CEDEX 17  
FRANCE**

**Confirmation d'un dépôt par télécopie**

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

**2 NATURE DE LA DEMANDE**

**Cochez l'une des 4 cases suivantes**

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

*Demande de brevet initiale*

N°

Date  /  /

*ou demande de certificat d'utilité initiale*

N°

Date  /  /

Transformation d'une demande de  
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date  /  /

**3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)**

**SOURIS TRANSGENIQUE POUR LA RECOMBINAISON CIBLEE MEDIEE PAR LA Cre-ER MODIFIEE"**

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ**

**OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE**

**LA DATE DE DÉPÔT D'UNE**

**DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date  /  /

N°

Pays ou organisation

Date  /  /

N°

Pays ou organisation

Date  /  /

N°

☐ **S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»**

**5 DEMANDEUR**

☐ **S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»**

Nom ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

**ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE EN  
GENETIQUE MOLECULAIRE (ADEREGEM)**

**ASSOCIATION LOI DU 1er JUILLET 1901**

**231, rue de Charenton, 75012 PARIS**

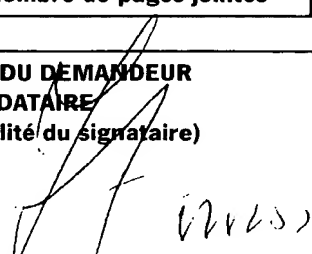

**FRANCE**

**Française**

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES	
DATE	<b>3 OCT 2000</b>
LIEU	<b>75 INPI PARIS</b>
N° D'ENREGISTREMENT	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	<b>0012570</b>

DB 540 W / 190600

<b>Vos références pour ce dossier :</b> (facultatif)		238632 D18961 PM
<b>6 MANDATAIRE</b>		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	26, avenue Kléber
	Code postal et ville	75116 PARIS
N° de téléphone (facultatif)		01 45 00 92 02
N° de télécopie (facultatif)		01 45 00 46 12
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance		<b>Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>
		

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1 / 1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) 238632 D18961 PM			
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0012570	
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>  SOURIS TRANSGENIQUE POUR LA RECOMBINAISON CIBLEE MEDIEE PAR LA Cre-ER MODIFIEE"			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE EN GENETIQUE MOLECULAIRE (ADEREGEM) : 231, rue de Charenton, 75012 PARIS - FRANCE			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).</b>			
<b>Nom</b>		CHAMBON Pierre	
<b>Prénoms</b>			
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	4, rue du Dr. Albert SCHWEITZER 67113 BLAESHEIM	
	<b>Code postal et ville</b>		
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		METZGER Daniel	
<b>Prénoms</b>			
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	21, avenue Jean-Jaurès 67100 STRASBOURG FR	
	<b>Code postal et ville</b>		
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>			
<b>Prénoms</b>			
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>		
	<b>Code postal et ville</b>		
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<p>9.10.2000</p> <p>Enlès</p>	

La présente invention concerne un organisme métazoaire, à l'exception de l'homme, et notamment une souris, caractérisé en ce qu'au moins une cellule de cet organisme comprend au moins une protéine de fusion  
5 entre une recombinaise Cre et un récepteur nucléaire aux œstrogènes modifié lui permettant de répondre aux anti-œstrogènes synthétiques mais non aux œstrogènes naturels, et une ou des séquence(s) d'ADN d'intérêt appartenant au génome dudit organisme dans laquelle  
10 (lesquelles) est (sont) inséré(s) un ou plusieurs site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinaise. L'invention couvre également les procédés mettant en œuvre ledit organisme pour la mutagenèse et l'analyse de la fonction biologique de la ou des  
15 séquence(s) d'ADN d'intérêt, notamment de gène(s) d'intérêt, tel RXR $\alpha$ .

L'aptitude à modifier le génome d'animaux, plus particulièrement de la souris par intégration de transgènes de manière aléatoire, ou à des endroits  
20 présélectionnés par recombinaison homologue, dans les cellules souches embryonnaires (cellules ES) a permis d'améliorer grandement notre compréhension de la fonction biologique des gènes de mammifères dans des conditions normales et/ou pathologiques (Jaenisch,  
25 1988; Capecchi, 1989). Néanmoins, ces techniques se sont avérées peu informatives dans un grand nombre de cas, notamment parce que les mutations héréditaires ainsi générées étaient létales durant le développement et/ou parce que leurs effets étaient pléiotropiques.

30 Pour pallier ces défauts, des stratégies de mutagenèse somatique conditionnelle ont été développées, particulièrement chez la souris ; elles

permettent d'induire sélectivement des mutations dans un type cellulaire donné (contrôle spatial) ou à un temps donné (contrôle temporel) au cours de la vie de l'animal.

5 Une première stratégie a consisté à combiner la recombinaison homologue ciblée avec les systèmes de recombinaison site-spécifiques basés sur l'utilisation de recombinases qui catalysent la réaction de recombinaison entre deux courtes séquences d'ADN de reconnaissance. Il fut montré que ces systèmes de recombinaison site-spécifiques, bien que d'origine microbienne pour la plupart, pouvaient fonctionner chez les eucaryotes supérieurs, tels que des plantes, des insectes et la souris (Sauer, 1994 ; Rajewsky et al., 1996; Sauer, 1998). Parmi les systèmes de recombinaison site-spécifiques utilisés communément, il convient de citer les systèmes Cre/Lox (Sauer, 1998) et FLP/FRT (Kilby et al., 1993). La stratégie habituellement employée consiste à insérer des sites loxP (ou FRT) dans les chromosomes de cellules ES par recombinaison homologue, ou par transgénèse classique, et puis à délivrer la Cre (ou FLP) pour que cette dernière catalyse la réaction de recombinaison. La recombinaison entre les deux sites loxP (ou FRT) peut être réalisée dans les cellules ES (Gu et al., 1993) ou dans des œufs fertilisés (Araki et al., 1995) par expression transitoire de la Cre ou en utilisant une souris transgénique Cre (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992). Une telle stratégie de mutagenèse somatique permet un contrôle spatial de la recombinaison, car l'expression de la recombinase est contrôlée par un promoteur spécifique d'un tissu donné ou d'une cellule

donnée. Cependant cette stratégie présente également des limitations car certaines altérations somatiques peuvent conduire à un phénotype létal à un stade précoce du développement, empêchant ainsi toute étude  
5 biologique ou physiologique ultérieure. Egalement, une expression non suffisamment spécifique de la recombinaise peut conduire à des événements de recombinaison dans un type cellulaire non désiré (Betz et al., 1996) qui, s'ils surviennent précocement au  
10 cours de l'embryogenèse, peuvent entraîner la recombinaison de l'ADN dans la plupart des tissus adultes, et de ce fait compliquer l'analyse du phénotype mutant.

Une seconde stratégie a consisté à contrôler  
15 l'expression des recombinaises dans le temps, afin de permettre un contrôle temporel de la recombinaison somatique. Pour ce faire, l'expression des recombinaises est contrôlée par des promoteurs inductibles (Kühn et al., 1995 ; Saint-Onge et al., 1996), tels que le  
20 promoteur inductible à l'interféron, par exemple. Ce système présente également des limitations, car il ne permet pas d'obtenir un contrôle spatial de la recombinaison.

Le couplage du système d'expression inductible à  
25 la tétracycline développé par H. Bujard (Gossen et al., 1992 ; WO 94 04672 ; EP 804 546) avec le système de recombinaise site-spécifique a permis de développer un système de modification somatique du génome contrôlée de manière spatio-temporelle. Un tel système est basé  
30 sur l'activation ou la répression par la tétracycline du promoteur commandant l'expression du gène de la recombinaise. Une telle méthode, bien qu'elle permette

d'obtenir un contrôle spatio-temporel de la recombinaison somatique, présente l'inconvénient d'être lourde à mettre en œuvre, car nécessitant la création d'un animal doublement transgénique.

5 Une nouvelle stratégie a pu être envisagée suite au développement de recombinaisons chimériques activées de manière sélective par le ligand naturel du récepteur des œstrogènes. En effet, l'observation que de nombreuses protéines, dont au moins deux enzymes (les  
10 tyrosine-kinases c-abl et src), voient leur activité contrôlée par des œstrogènes, lorsque celui-ci est lié au domaine de liaison au ligand (LBD, pour « ligand-binding domain ») du récepteur des œstrogènes  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (Jackson et al., 1993; Picard et al., 1994), a permis  
15 de développer des stratégies de recombinaison site-spécifique contrôlée de manière spatio-temporelle (Logie et al., 1995; Metzger et al., 1995). Toutefois pour utiliser de telles recombinaisons chimériques afin de réaliser avec succès la mutagenèse somatique  
20 conditionnelle chez des Vertébrés (notamment la souris) qui produisent des œstrogènes, il était nécessaire de créer des recombinaisons qui ne soient pas activées par les œstrogènes présents chez l'animal, sans quoi le contrôle temporel de la recombinaison des gènes cibles  
25 ne pourrait être obtenu. Ainsi, des mutations ont été introduites dans le LBD de ER $\alpha$ , et il a été montré, dans des cellules en culture, que la recombinaison chimérique Cre-ER<sup>T</sup> ne répond plus aux œstrogènes naturels, bien qu'étant activée efficacement par des  
30 antiœstrogènes tels que le 4-hydroxytamoxifène (OHT) (Feil et al., 1996).

La faisabilité de la recombinaison somatique site-spécifique activée par un ligand anti-œstrogénique a ainsi été démontrée pour des séquences d'ADN « Reporter », chez la souris, et notamment dans 5 différentes lignées de souris transgéniques qui expriment la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> activée par le Tamoxifène (Tam) (Feil et al., 1996; Brocard et al., 1997; Indra et al., 1999). La faisabilité de la recombinaison site-spécifique activée par un ligand 10 pour un gène présent dans son environnement chromatinien naturel a été démontrée chez la souris par Schwenk et al. (1998). Schwenk et al. ont ainsi réalisé la délétion inductible par injection de Tamoxifène d'un gène polβ dans les cellules B, en utilisant une souris 15 exprimant spécifiquement dans les lymphocytes B, une protéine de fusion entre la recombinase Cre et le domaine de liaison au ligand du récepteur nucléaire aux œstrogènes humain muté. Cependant, la technologie développée par Schwenk et al. ne permet pas d'obtenir 20 une efficacité satisfaisante de recombinaison site-spécifique contrôlée de manière spatio-temporelle dans les cellules exprimant la protéine de fusion, car l'efficacité varie entre quelques pourcents et 80%, malgré l'utilisation de fortes doses d'OHT (cinq 25 injections de 8mg). Par ailleurs, les résultats présentés par Schwenk et al. montrent qu'en l'absence de ligand synthétique, l'activité de la protéine de fusion utilisée peut être induite par des ligands naturels générant un "bruit de fond" résiduel non 30 négligeable pouvant être mis en évidence par PCR.

Jusqu'à présent, la possibilité de réaliser la recombinaison somatique site-spécifique, activée par un



ligand, de séquence(s) d'ADN chromosomique, dans leur environnement chromatinien naturel, n'a donc jamais pu être mise en œuvre de façon satisfaisante chez l'animal, notamment la souris, c'est-à-dire avec une  
5 très grande efficacité en présence de ligand synthétique et avec un "bruit de fond" négligeable, voire nul en son absence.

Comme le souligne Schwenk et al. dans la discussion de leur article, il existe un réel besoin de  
10 développer des animaux transgéniques dans les cellules desquels la recombinaison site-spécifique pourrait être induite de manière spatio-temporelle avec une efficacité voisine de 100% en présence de ligand synthétique, et qui ne surviendrait dans aucune cellule  
15 en absence de ligand synthétique et/ou en présence de ligand naturel.

Par ailleurs, il existe également un besoin de développer des recombinases chimériques de sensibilité accrue au ligand synthétique, afin d'éviter d'injecter  
20 aux animaux des doses massives de ligand synthétique susceptibles de provoquer chez ces animaux non seulement des souffrances injustifiées, mais aussi d'affecter le métabolisme général de l'animal, ce qui fausserait les études physiologiques et  
25 comportementales ultérieures.

De manière inattendue, les inventeurs ont résolu les problèmes précédemment évoqués, jusqu'alors non solutionnés, en combinant la sélection de nouvelles mutations dans le domaine de liaison au ligand du  
30 récepteur nucléaire des œstrogènes humains, la sélection d'une région charnière adéquate entre les deux domaines de la recombinase chimérique, et la

sélection de promoteurs adéquats pour diriger l'expression de la recombinaise chimérique dans un tissu donné.

La présente invention porte donc sur un organisme métazoaire, à l'exception de l'homme, caractérisé en ce qu'au moins une cellule dudit organisme comprend au moins:

- (i) une protéine de fusion comprenant séquentiellement:
  - 10 - une protéine recombinaise;
  - une région charnière d'au moins 15 acides aminés;
  - un polypeptide comprenant le domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire des œstrogènes humains, ou du récepteur nucléaire des œstrogènes des vertébrés, et leurs variants naturels ou l'un de leurs fragments ; ledit polypeptide présentant au moins une mutation par rapport à la forme sauvage desdits domaines de liaison du ligand, ou de leurs variants naturels, ou de leurs fragments, et ladite protéine de fusion ayant une activité recombinaise négligeable, voire nulle, en présence de ligand naturel, tel par exemple l'oestradiol, et une activité recombinaise induite par de faible quantité de ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique, tel par exemple le Tam et l'OHT ;
  - 20
  - 25
- (ii) une ou des séquence(s) d'ADN génique ou inter-génique d'intérêt appartenant naturellement au génome dudit organisme dans laquelle (lesquelles) est(sont) inséré(s) un ou plusieurs site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinaise, la
  - 30

ou lesdites séquence(s) d'ADN d'intérêt étant localisée(s) dans l'un ou plusieurs des chromosomes du génome de ladite cellule.

Par «organisme métazoaire», on entend désigner  
 5 tout organisme animal, à l'exception de l'homme, constitué par plusieurs cellules. Selon un mode préféré de réalisation, il s'agit d'un vertébré, tel par exemple un mammifère, un oiseau, un poisson. De manière préférée, il s'agit d'un mammifère, tel par exemple un  
 10 bovin, un porc, un caprin, un ovin, un équidé, un rongeur. Selon un mode encore plus préféré, il s'agit d'un rongeur, tel la souris ou le rat.

Par «protéine recombinase», on entend désigner les recombinaisons de la famille des intégrases qui  
 15 catalysent l'excision, l'insertion, l'inversion ou la translocation de fragments d'ADN au niveau de sites spécifiques de reconnaissance desdites recombinaisons (Sternberg et al., 1986; Sauer, et al., 1990; Barbonis et al., 1993; Kilby et al., 1993; Sauer, 1994; Denisen  
 20 et al., 1995). Ces recombinaisons sont actives dans les cellules animales (Sauer, 1994).

La protéine recombinase de l'invention est sélectionnée de préférence dans le groupe des recombinaisons sites-spécifiques composé de la  
 25 recombinase Cre du bactériophage P1, la recombinase FLP de *Saccharomyces cerevisiae*, la recombinase R de pSR1 de *Zygosaccharomyces rouxii*, la recombinase A de pKD1 de *Kluyveromyces drosophilarius*, la recombinase A de pKW1 de *Kluyveromyces waltii*, l'intégrase  $\lambda$  Int, la  
 30 recombinase du système de recombinaison GIN du phage Mu, de la recombinase bactérienne  $\beta$  (Diaz et al., 1999) ou une variante de celles-ci.

La recombinaise Cre («cyclization recombination») qui est une intégrase de 38 KDa du bactériophage P1 catalyse, en l'absence de cofacteurs, la recombinaison entre deux séquences d'ADN de 34 paires de bases  
 5 appelées « site loxP » (Sauer et al., 1990). La position sur une ou plusieurs molécules d'ADN, et l'orientation de sites loxP l'un par rapport à l'autre, déterminent le type de fonction de la recombinaise Cre : excision, insertion, inversion ou translocation. Ainsi  
 10 l'activité recombinaise de Cre est une inversion, lorsque deux sites loxP sont tête-bêche sur un même fragment d'ADN et une excision, lorsque les sites loxP sont en répétition directe sur un même fragment d'ADN. L'activité de la recombinaise est une insertion  
 15 lorsqu'un site loxP est présent sur un fragment d'ADN, une molécule d'ADN telle qu'un plasmide contenant un site loxP pouvant être insérée au niveau dudit site loxP. La recombinaise Cre peut également induire une translocation entre deux chromosomes à condition qu'un  
 20 site loxP soit présent sur chacun d'eux (Babinet, 1995). De manière plus générale, la recombinaise Cre est donc capable de catalyser la recombinaison entre une ou plusieurs molécules d'ADN différentes, à condition qu'elles soient porteuses de sites loxP.

25 La recombinaise FLP du système FLP/FRT est une recombinaise de 43 KDa de *Saccharomyces cerevisiae* capable du même type d'action que la recombinaise Cre sur des fragments d'ADN encadrés par des sites de reconnaissance FRT (Kilby et al., 1993).

30 De manière préférée, la recombinaise selon l'invention est la recombinaise Cre du bactériophage P1 et ses variants naturels ou synthétiques, et lesdits

sites de reconnaissance spécifiques de ladite recombinaise Cre sont choisis de préférence dans le groupe composé des séquences Lox P, Lox 66, Lox 71, Lox 511, Lox 512, Lox 514.

- 5 Par « variant de la protéine recombinaise », on entend désigner l'ensemble des recombinaises sauvages ou leurs fragments pouvant exister naturellement et qui correspond notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions de résidus d'acides aminés.
- 10 Ces recombinaises et leurs fragments sont de préférence issus du polymorphisme génétique de la population. Par « fragment de recombinaise », on entend désigner toute partie de recombinaise présentant au moins une activité recombinaise. Par variant de la protéine recombinaise on
- 15 entend également désigner les variants synthétiques pour lesquels les modifications précédentes ne sont pas présentes naturellement, mais ont été introduites artificiellement, par ingénierie génétique par exemple. Ainsi, les recombinaises issues de fusion chimérique
- 20 constituent-elles des variants synthétiques selon l'invention. De telles recombinaises ont été décrites par exemple dans Shaikh et Sadowski (2000).

Ladite région charnière selon l'invention comprend la région charnière D du récepteur nucléaire des

25 œstrogènes, de préférence du récepteur nucléaire humain  $\alpha$  des œstrogènes, ou l'un de ses fragments.

La région charnière D (région 263 à 301 de la séquence SEQ ID N° 2) est une région située entre la région C du ER qui contient le domaine de liaison à

30 l'ADN (région 180-262 de la séquence SEQ ID N° 2) et le domaine de liaison du ligand (région 302 à 552 de la séquence SEQ ID N° 2).

De préférence cette région charnière comporte séquentiellement au moins (i) deux acides aminés correspond à l'introduction de site de restriction, de «linker», ou d'adaptateur, nécessaires au clonage du gène de fusion, et (ii) un fragment de la région charnière D du récepteur nucléaire humain  $\alpha$  des œstrogènes, correspondant aux acides aminés 282 à 301 de la séquence SEQ ID N°2. De manière préférée, ledit site de restriction est un site XhoI et les deux acides aminés correspondants sont la leucine et la glutamine.

La région charnière selon l'invention a une taille d'au moins 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 100, 150, 200, 250, 292 acides aminés. Selon un mode préféré de réalisation, ladite région charnière comporte au moins 15 acides aminés et au plus 54 acides aminés. De manière encore plus préférée, la région charnière comporte 23 acides aminés. La largeur de la région charnière influence la régulation par le ligand de l'activité recombinase.

La région charnière selon l'invention peut être constituée par un peptide fonctionnellement équivalent à ladite région charnière D.

Les récepteurs des œstrogènes (ER) sont des protéines régulatrices de transcription de gènes qui médient l'action des œstrogènes dans les cellules cibles. Les ER appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires qui présentent une structure modulaire commune: (i) une région A/B N-terminale variable contenant l'activité de transactivation constitutive AF-1, (ii) un domaine central C de liaison à l'ADN (DBD pour « DNA-Binding Domain ») hautement conservé entre les différentes espèces et permettant la

liaison du récepteur à son élément de réponse ADN spécifique, (iii) et un domaine de liaison du ligand (LBD), localisé dans la région C-terminale du ER (pour les articles de synthèse et références voir Evans, 5 1988 ; Beato et al., 1989 ; Gronemeyer, 1991 ; Green and Chambon, 1998; Parker, 1993; Simons, 1994).

Les récepteurs nucléaires des œstrogènes selon l'invention sont choisis parmi les récepteurs nucléaires des œstrogènes humains, et parmi les 10 récepteurs nucléaires des œstrogènes des vertébrés tels par exemple les différentes espèces de primates, les bovins, les porcins, les ovins, les caprins, les félins, les canidés, les équidés, les oiseaux, les poissons, les rongeurs, notamment le rat et la souris.

15 Selon un mode préféré de réalisation, l'organisme d'origine du récepteur des œstrogènes selon l'invention est caractérisé en ce que ledit domaine de liaison du ligand (LBD) de récepteur nucléaire des œstrogènes, ou ses variants naturels, ou l'un de leurs fragments, est 20 humain et est choisi parmi les LBD des récepteurs nucléaires des œstrogènes humains  $\alpha$  et  $\beta$  (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ). Selon un mode encore préféré, il s'agit du LBD du récepteur nucléaire des œstrogènes humains  $\alpha$  correspondant aux acides aminés 302 à 552, ou ses 25 variants naturels, ou l'un de leurs fragments.

Par « variant naturel », on entend désigner l'ensemble des LBD des récepteurs nucléaires des œstrogènes ou leurs fragments pouvant exister naturellement, en particulier chez l'être humain, et 30 correspondant notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions de résidus d'acides aminés. Ces variants naturels, sont issus en

général du polymorphisme génétique de la population, et ont une activité qui n'est pas substantiellement modifiée par rapport au récepteur sauvage.

Il est également compris dans la portée de l'invention, les polypeptides homologues aux LBD des récepteurs nucléaires des œstrogènes sauvages, ou à leurs variants, ou à l'un de leurs fragments, et qui présentent certaines modifications en particulier une délétion, addition, substitution d'au moins un acide aminé, une troncature, un allongement et/ou une fusion chimérique.

Par « fragment de récepteur nucléaire », on entend désigner toute partie des LBD récepteurs nucléaires des œstrogènes présentant au moins l'activité LBD.

Ladite protéine de fusion selon l'invention est donc de préférence Cre-ER et comprend la protéine recombinase Cre, à laquelle est fusionnée une partie de la région charnière D et le LBD (acides aminés 282 à 595 de la séquence SEQ ID N° 2) du récepteur nucléaire des œstrogènes humain  $\alpha$  muté (SEQ ID N° 2). La protéine de fusion selon l'invention comprend au moins la partie du récepteur nucléaire aux œstrogènes ayant une activité de liaison du ligand.

Ledit LBD du récepteur nucléaire, ou l'un de ses fragments présente au moins une mutation. Cette mutation est de préférence choisie dans le groupe :

- mutation (G521R) glycine vers arginine en position 521 de la séquence SEQ ID N° 2 ou d'un variant naturel de cette séquence;
- mutation (G400V) glycine vers valine en position 400 de la séquence SEQ ID N° 2 ou d'un variant naturel de cette séquence;



- mutation (méthionine-leucine) vers (alanine-alanine) située en position 543-544 (mutation M543A/L544A) de la séquence SEQ ID N° 2 ou d'un variant naturel de cette séquence.

5 Par « mutation », on entend désigner n'importe quels changements intervenus dans la séquence du récepteur nucléaire des œstrogènes, et notamment du récepteur nucléaire humain  $\alpha$  des œstrogènes, autres que ceux présents dans ses variants naturels, et/ou dans  
10 ses homologues humains ou vertébrés, et qui modifient de façon substantielle l'activité de la protéine recombinase fusionnée audit récepteur ou audit domaine de liaison du ligand, en réponse à la liaison d'un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique.

15 Parmi les mutations susceptibles d'être introduites dans le LBD du récepteur nucléaire des œstrogènes, il convient de citer, les mutations ponctuelles, les délétions, les insertions, les substitutions. Toutefois, il convient de sélectionner  
20 uniquement les mutations introduites dans le LBD des récepteurs nucléaires aux œstrogènes qui permettent une induction de l'activité de la recombinase Cre fusionnée audit récepteur par un ligand synthétique à faible concentration, tout en évitant au mieux que les ligands  
25 naturels de ce récepteur présents naturellement dans l'organisme métazoaire n'induisent une activité basale. De même, il conviendra de sélectionner les mutations qui ne confèrent pas d'activité à la recombinase Cre fusionnée audit récepteur en absence de ligand.

30 La mutation G521R constitue une mutation LBD du ER selon l'invention. Cette mutation est similaire à la mutation G525R introduite dans le LBD du ER de la

souris (mER) qui réduit l'affinité pour le ligand naturel, l'œstradiol, d'environ 1000 fois, sans altérer la liaison du ligand synthétique, le 4-hydroxyTamoxifène (OHT) (Danielan et al., 1993). Ainsi, 5 les inventeurs ont montré que l'activité recombinaise de la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> (T = pour inductible au Tamoxifène) qui porte la mutation G521R et l'acide aminé glycine en position 400, appelée Cre-ER(GR) dans l'article de Feil et al., 1997, est dépendante de 10 l'addition d'OHT ou de Tam dans le milieu de culture de cellules transfectées. Par contre, aucune activité recombinaise n'est observée en présence d'OHT lorsque la protéine de fusion porte la mutation G521R et la mutation G400V (mutant appelé Cre-ER(VR) dans Feil et 15 al., (1997)).

Les inventeurs ont également créé la protéine de fusion, correspondant au triple mutant G400V/M543A/L544A appelé Cre-ER<sup>T2</sup> (Feil et al., 1997). Cette protéine de fusion présente une activité 20 recombinaise dans des cellules en culture induite par l'anti-œstrogène Tam ou OHT, mais pas par le ligand naturel œstradiol; par ailleurs, l'activité maximale de Cre-ER<sup>T2</sup> est induite pour des doses de Tam ou OHT inférieures à celles nécessaires pour activer Cre-ER<sup>T</sup>. 25 Cette sensibilité accrue au Tam ou OHT de Cre-ER<sup>T2</sup> par rapport à Cre-ER<sup>T</sup> a été vérifiée chez des souris transgéniques exprimant les recombinaises chimériques sélectivement dans la couche basale de l'épiderme, sous le contrôle du promoteur de la cytokératine 5 (Indra et 30 al., 1999). Les inventeurs ont observé que la translocation de Cre-ER<sup>T2</sup> du cytoplasme dans le noyau,

ainsi que l'excision de séquences d'ADN encadrées de sites loxP d'un gène «rapporter» sont induites à des doses environ dix fois inférieures à celles nécessaires pour Cre-ER<sup>T</sup>.

5 Dans le but d'augmenter encore la sensibilité de la recombinaise chimérique Cre-ER<sup>T2</sup> au tamoxifène, les inventeurs ont remplacé dans Cre-ER<sup>T2</sup> la valine en position 400 par une glycine. Cette nouvelle protéine de fusion qui correspond au double mutant M543A/L544A  
10 appelé Cre-ER<sup>T3</sup> présente une sensibilité accrue au ligand synthétique anti-oestrogénique tel que le Tam et l'OHT, sans que l'activité recombinaise de cette protéine soit induite par le ligand naturel oestradiol.

Les inventeurs ont ainsi montré que pour des doses  
15 de Tam injectées 10 fois inférieures, l'activité recombinaise dans les cellules d'une souris transgénique Cre-ER<sup>T3</sup> est supérieure à celle d'une souris Cre-ER<sup>T2</sup> (voir exemple 5).

Selon un mode préféré de réalisation, la protéine  
20 de fusion selon l'invention est Cre-ER<sup>T2</sup> dont le LBD du ER présente la mutation G400V/M543A/L544A. Selon un autre mode préféré de réalisation, la protéine de fusion est Cre-ER<sup>T3</sup>, dont le LBD du ER présente la mutation M543A/L544A.

25 C'est donc un des objets de la présente invention de fournir une protéine de fusion Cre-ER, qui présente des mutations, dans le LBD du ER $\alpha$  humain de préférence choisies parmi les mutations G521R, G400V, M543A, et L544A, dont l'activité recombinaise n'est pas induite  
30 par les ligands naturels, et est fortement induite par de faible quantité de ligand synthétique anti-

oestrogénique. De préférence, cette protéine de fusion est Cre-ER<sup>T</sup>, Cre-ER<sup>T2</sup>, Cre-ER<sup>T3</sup>. La présente invention concerne également ledit gène de fusion codant pour ladite protéine, ledit vecteur d'expression de ladite protéine, ainsi que la cellule hôte correspondant, et  
5 l'animal transgénique correspondant, qui exprime ladite protéine de fusion dans un type cellulaire particulier, de préférence, l'épiderme, le foie ou le tissu adipeux.

La protéine de fusion Cre-ER de la présente  
10 invention comprend donc tout ou partie d'un récepteur nucléaire des œstrogènes et une protéine recombinase dont l'activité est inducible beaucoup plus fortement par liaison dudit récepteur ou dudit domaine de liaison du ligand (LBD) dudit récepteur avec un dit anti-  
15 œstrogène qu'avec un ligand naturel. Ladite protéine de fusion Cre-ER permet de réaliser une recombinaison entre des sites loxP, dans une cellule de l'organisme de l'invention, suite à un traitement par un anti-œstrogène. En l'absence de traitement, ou en présence  
20 de concentrations de ligands tels les œstrogènes naturels allant jusqu'à  $10^{-6}$  M, aucune excision n'est observée. Ce système permet donc de libérer l'activité recombinase de la protéine chimérique à un moment donné et choisi. Ladite protéine de fusion Cre-ER peut être  
25 exprimée dans des cellules contenant des sites loxP, sans modifier le locus contenant les sites loxP. La recombinaison au niveau des sites loxP a lieu uniquement après traitement avec un anti-œstrogène tel que le Tam ou l'OHT. De plus en exprimant ladite  
30 protéine de fusion Cre-ER dans un organisme selon l'invention, de préférence un animal, sous le contrôle d'un promoteur à spécificité cellulaire, on peut

obtenir une recombinaison entre des sites loxP, spécifiquement dans ces cellules.

Par « ligand synthétique », on entend désigner tout type de composé susceptible de se lier au récepteur nucléaire des œstrogènes, et présenter des activités agonistes et/ou antagonistes, en fonction de l'espèce, du tissu ou du type cellulaire. De préférence, et sans caractère limitatif, le ligand synthétique selon l'invention est doté d'activité anti-œstrogénique, de préférence il s'agit de l'agent thérapeutique antiœstrogénique Tamoxifène (Tam), mais également de son métabolite le 4-hydroxyTamoxifène (OHT). Les antiœstrogènes ICI 164 384 et ICI 182 780 sont également des ligands synthétiques selon l'invention.

La présente invention fournit donc un organisme métazoaire transgénique et plus particulièrement un animal transgénique, et notamment une souris transgénique : (i) dont au moins une cellule contient une ou plusieurs séquences d'ADN chromosomiques qui sont présentes dans leur contexte chromatinien naturel et sont encadrées de sites loxP (floxées) ; (ii) qui exprime de préférence une recombinase Cre chimérique de manière tissu-spécifique dans un ou plusieurs type(s) cellulaire(s) de l'organisme (iii) dont l'activité de la recombinase Cre chimérique est négligeable, voire nulle en présence d'œstrogène; (iv) dont l'activité de la recombinase chimérique est activée par des concentrations faibles d'un anti-œstrogène (de 0,001 à 1 mg de Tamoxifène/souris/jour, pendant cinq jours); (v) et enfin dont la recombinase Cre est capable de catalyser avec une efficacité voisine de 100% la

recombinaison somatique ciblée site-spécifique dans le noyau, dans un environnement chromatinien naturel de la ou des séquence(s) d'ADN floxée(s).

Les doses de ligand synthétique injectées dans  
5 l'organisme métazoaire selon l'invention sont faibles. Par faible, on entend désigner des quantités inférieures ou égales à 4 mg/souris adulte/jour, de préférence inférieures ou égales à 2 mg/souris adulte/jour, de manière préférée inférieure ou égale à  
10 1 mg/souris adulte/jour. Selon un mode encore plus préféré, cette quantité peut être inférieure ou égale à 0,5 mg, 0,25 mg, 0,10 mg, 0,075 mg, 0,05 mg, 0,025 mg, 0,001 mg par souris adulte et par jour.

Il est bien entendu, qu'un homme du métier sera à  
15 même d'adapter ces quantités, en fonction de l'organisme, de son poids et de son âge.

L'efficacité de la recombinaison somatique ciblée est estimée par les techniques connues de l'homme du métier. Cette efficacité est estimée par la fréquence  
20 des événements de recombinaison catalysée par ladite recombinaison. Ces événements peuvent être mis en évidence par PCR ou par Southern Blotting; la fréquence de recombinaison étant estimée en faisant le rapport de la représentation des différents allèles dans les  
25 cellules d'un tissu. Les fréquences des différents allèles peuvent être estimées en effectuant le dosage de l'intensité des bandes correspondantes sur un gel électrophorèse de produit d'amplification PCR ou d'ADN génomique (Southern Blotting).

30 L'utilisation de la PCR rend cette méthode d'estimation extrêmement sensible et permet de détecter

la présence de cellules de l'organisme dont le génome n'a pas subi de recombinaison site-spécifique ciblée.

Une autre manière d'estimer l'efficacité de la recombinaison peut être réalisée indirectement par immunohistochimie, en analysant l'expression de la  
5 séquence génique à inactiver par exemple.

Selon un mode préféré de réalisation, ladite protéine de fusion est codée par un gène de fusion intégré dans un ou plusieurs des chromosomes de ladite  
10 cellule dudit organisme. Selon un autre mode de réalisation, la protéine de fusion est codée par un gène de fusion intégré dans un vecteur d'expression. Le gène de fusion selon l'invention est introduit dans la cellule sous la forme d'un vecteur d'expression ou d'un  
15 de ses fragments. Par vecteur, on entendra désigner une séquence nucléotidique capable de s'auto-répliquer et susceptible d'être amplifiée de manière extra-chromosomique. Le vecteur peut être en particulier un ADN plasmidique bactérien, un cosmide, de l'ADN de  
20 phage, de l'ADN viral, ou un mini-chromosome (BAC, YAC,...). Un tel vecteur peut être intégratif, c'est-à-dire s'intégrer dans le génome de la cellule hôte ou exister à l'état de réplicon extra-chromosomique. Lorsqu'il existe sous la forme d'un réplicon extra-  
25 chromosomique, le vecteur d'expression est capable de se répliquer de manière autonome. Lorsqu'il s'agit d'un fragment d'un vecteur d'expression, de préférence ce fragment s'intègre dans le génome cellulaire. Le vecteur d'expression ou un de ses fragments comporte au  
30 moins le gène de fusion et un promoteur ou éléments d'expression permettant de diriger et de contrôler

l'expression de ladite protéine de fusion dans au moins une cellule du dit organisme.

Le vecteur d'expression comporte en outre des signaux d'initiation et de terminaison de la transcription, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé.

Par éléments contrôlant l'expression, on entend désigner toutes les séquences d'ADN impliquées dans la régulation de l'expression génique, c'est-à-dire la séquence promotrice minimale, les séquences amonts, les séquences activatrices (« enhancers »), éventuellement les séquences inhibitrices (« silencers »), les séquences « insulator ».

De préférence, le gène de fusion est placé sous le contrôle d'éléments d'expression tissus-spécifiques ou cellules-spécifiques ou ubiquitaires.

Les éléments d'expression tissus-spécifiques ou promoteurs tissus-spécifiques sont choisis parmi les promoteurs qui permettent d'obtenir une expression spécifique, et de préférence forte, dans une ou plusieurs cellule(s), tissu(s), type(s) cellulaire(s), ou organe(s) de l'organisme selon l'invention. Ces promoteurs peuvent être ou non hétérologues à l'organisme et être naturellement présents ou non dans le génome de l'organisme. A titre d'exemple non limitatif de promoteurs tissus-spécifiques, on peut citer les promoteurs des gènes :

- de la cytokératine, et plus particulièrement de la cytokératine 5 (K5) et de la cytokératine 14 (K14),



qui dirige l'expression du gène dans les kératinocytes de l'épiderme;

- de l' $\alpha$ -1-antitrypsine qui dirige l'expression du gène dans les hépatocytes ;
- 5 - de la protéine adipeuse 2 (aP2) qui dirige l'expression du gène dans les adipocytes.

Selon un mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de la cytokératine 5 (K5) et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T</sup>.

Selon un second mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de la cytokératine 5 (K5) et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T2</sup>.

15 Selon un troisième mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de la cytokératine 5 (K5) et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T3</sup>.

Selon un quatrième mode préféré de réalisation, 20 ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de la cytokératine 14 (K14) et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T</sup>.

Selon un cinquième mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit 25 promoteur est le promoteur de la cytokératine 14 (K14) et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T2</sup>.

Selon un sixième mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de la cytokératine 14 (K14) 30 et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T3</sup>.

Selon un septième mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de l' $\alpha$ -1-antitrypsine et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T</sup>.

5 Selon un huitième mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de l' $\alpha$ -1-antitrypsine et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T2</sup>.

10 Selon un neuvième mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de l' $\alpha$ -1'-antitrypsine et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T3</sup>.

15 Selon un dixième mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de la protéine adipeuse 2 (aP2) et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T</sup>.

20 Selon un onzième mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de la protéine adipeuse 2 (aP2) et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T2</sup>.

Selon un douzième mode préféré de réalisation, ledit organisme est caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur de la protéine adipeuse 2 (aP2) et ledit gène de fusion Cre-ER<sup>T3</sup>.

25 Selon un premier mode de réalisation, l'organisme selon l'invention est caractérisé en ce que ledit gène de fusion est de séquence SEQ ID N° 3 et code pour la protéine Cre-ER<sup>T</sup> de séquence SEQ ID N° 4.

30 Selon un second mode de réalisation, l'organisme selon l'invention est caractérisé en ce que ledit gène

de fusion code de séquence SEQ ID N° 5 pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T2</sup> de séquence SEQ ID N° 6.

Selon un troisième mode de réalisation, l'organisme selon l'invention est caractérisé en ce que  
5 ledit gène de fusion code de séquence SEQ ID N° 7 pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T3</sup> de séquence SEQ ID N° 8.

L'article de Metzger et Feil (1999) donne à titre d'exemple non limitatif (cf. tableau page 471) une liste de promoteurs tissus-spécifiques susceptibles  
10 d'être utilisés pour diriger l'expression de la protéine Cre dans différents tissus.

Les promoteurs tissus-spécifiques sont d'une manière plus générale choisis parmi ceux qui dirigent l'expression d'une protéine de fusion dans un système  
15 physiologique, un organe, un tissu, un type cellulaire, ou une cellule particulière, parmi lesquels il convient de citer de manière non exhaustive le système nerveux en général, et notamment le cerveau, le cervelet, les neurones, les motoneurones, les cellules gliales, les  
20 cellules de Schwann, l'hypophyse, l'hypothalamus, la glande pituitaire, l'hippocampe et le cortex, le cœur, les cardiomyocytes ventriculaires et les cardiomyocytes auriculaires, les poumons, les os, les yeux et plus particulièrement la rétine et le cristallin, la peau et  
25 plus particulièrement le derme et l'épiderme, les muscles, et plus particulièrement les muscles squelettiques, le muscle cardiaque, les muscles lisses, la glande mammaire, les gonades et plus particulièrement les testicules, les ovaires, les  
30 cellules germinales, les ovocytes, les ovogonies, les spermatozoïdes, les spermatogonies et les spermatocytes, le rein, le foie et notamment les

hépatocytes, la rate, le pancréas et notamment les cellules de Langerhans et les cellules  $\beta$ , la langue, l'œsophage, le tissu adipeux, les cellules endothéliales.

5 Les éléments d'expression ubiquitaire ou promoteurs ubiquitaires sont choisis parmi les promoteurs qui permettent d'obtenir une expression, de préférence forte, dans l'ensemble, ou pour le moins dans une grande proportion d'organes, ou de tissus de  
10 l'organisme selon l'invention. Ces promoteurs peuvent être hétérologues ou non à l'organisme selon l'invention. A titre d'exemple non limitatif de promoteurs ubiquitaires, on peut citer le promoteur du cytomégalovirus (CMV) (Schmidt et al., 1990) et le  
15 promoteur inducible par l'interféron (Mx1) (Hug et al., 1998 ; Arnheiter et al., 1990). En outre, les éléments d'expression, ou promoteurs selon l'invention, peuvent assurer un contrôle constitutif ou inducible de l'expression du gène de fusion. Parmi les éléments  
20 assurant une expression inducible, il convient de citer les promoteurs eucaryotiques inducibles par les métaux lourds (Mayo et al., 1982 ; Brinster et al., 1982 ; Seark et al., 1985), par un choc thermique (Nover et al., 1991), par les hormones (Lee et al.,  
25 1981 ; Hynes et al., 1981 ; Klock et al., 1987 ; Israel et al., 1989), par l'interféron (Hug et al., 1998 ; Arnheiter et al., 1990). Il convient également de citer les éléments d'expression procaryotiques inducibles tels que le système répresseur Lac  
30 (LacR/opérateur/inducteur) d'E. coli (Hu et al., 1987 ; Brown et al., 1987 ; Figge et al., 1988 ; Deuschle et

*al.*, 1990 ; Labow et *al.*, 1990), le système de résistance à la tétracycline d'*E. coli* (Gossen et *al.*, 1992) (WO 94 04 672, EP 804 565).

Dans le cas où l'intégration du gène de fusion est  
5 ciblée par recombinaison homologue dans le génome de l'organisme (« Knock-in »), le gène de fusion peut être dépourvu de promoteurs ou d'éléments d'expression et être placé sous le contrôle d'un promoteur ou d'éléments d'expression endogènes.

10 Les technologies de l'ADN recombinant utilisées pour la construction du vecteur d'expression selon l'invention sont celles connues et communément utilisées par les hommes de l'art. Les techniques standard sont utilisées pour le clonage, l'isolement de  
15 l'ADN, l'amplification, et la purification ; les réactions enzymatiques impliquant l'ADN ligase, l'ADN polymérase, les endonucléases de restriction sont effectuées selon les recommandations du fabricant. Ces techniques et les autres sont généralement réalisées  
20 selon Sambrook et *al.* (1989).

Le vecteur selon l'invention ou le fragment de vecteur peuvent être introduits dans la cellule hôte par des méthodes standard telles que par exemple la micro-injection dans un pronucléus, la transfection par  
25 précipitation au phosphate de calcium, la lipofection, l'électroporation, le choc thermique.

Le gène de fusion selon l'invention comprend de préférence dans le sens 5' → 3' :

- un fragment d'ADN codant pour la recombinaise Cre du  
30 bactériophage P1 ou l'un de ses variants ;
- un fragment d'ADN d'au moins 45 nucléotides codant au moins soit pour tout ou partie de la région charnière

- D d'un récepteur nucléaire des œstrogènes, région située entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison du ligand, soit pour un peptide fonctionnellement équivalent à ladite région
- 5 charnière D ; et
- un fragment d'ADN codant pour le domaine de liaison du ligand (LBD) d'un récepteur nucléaire des œstrogènes ou de leurs variants, ledit fragment présentant au moins une mutation conférant au LBD la
- 10 capacité de répondre aux anti-œstrogènes synthétiques mais non aux agonistes œstrogéniques naturels.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la protéine de fusion est directement introduite dans l'organisme, ou dans une cellule de l'organisme, cette

15 introduction pouvant se faire par injection dans un tissu ou un organe dans le cas d'un organisme, ou par micro-injection dans le cas d'une cellule.

La séquence d'ADN d'intérêt selon l'invention est un gène ou une séquence inter-génique. Selon un mode

20 préféré de réalisation de l'invention, la séquence d'ADN d'intérêt est un gène, la fonction du gène pouvant être connue ou inconnue. L'étude d'un organisme selon l'invention présentant une modification d'un gène ou de tout autre région génomique de fonction inconnue

25 permet de contribuer à la définition de la fonction de ce gène ou de cette région inter-génique. Tous les gènes et régions inter-géniques d'un organisme métazoaire sont susceptibles d'être utilisés dans le cadre de la présente invention ; plus particulièrement,

30 il convient de citer les gènes  $RXR_{\alpha}$ ,  $RXR_{\beta}$ ,  $RXR_{\gamma}$ ,  $RAR_{\alpha}$ ,  $RAR_{\beta}$ ,  $RAR_{\gamma}$ ,  $SNF2_{\beta}$ . Par séquence d'ADN d'intérêt

appartenant naturellement au génome dudit organisme, ou séquence d'ADN d'intérêt dans son environnement chromatinien naturel, on entend désigner une séquence d'ADN endogène, tel un gène endogène, présent dans le  
 5 génome à son(ses) locus(loci) naturel(s).

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'organisme selon l'invention est un animal, notamment une souris, caractérisé en ce qu'au moins une des cellules de ladite souris comprend :

- 10 - un gène de fusion codant pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> de séquence SEQ ID N° 4, ou Cre-ER<sup>T2</sup> de séquence ID N° 6, ou Cre-ER<sup>T3</sup> de séquence ID N° 8, ledit gène de fusion étant sous le contrôle du promoteur de la cytokératine K5 ;
- 15 - une ou des séquences d'ADN chromosomique d'intérêt dans leur contexte chromatinien naturel et encadrée(s) de site lox (« floxées »).

Selon un second mode préféré de réalisation de l'invention, l'organisme selon l'invention est  
 20 caractérisé en ce qu'au moins une des cellules de ladite souris comprend :

- un gène de fusion codant pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> de séquence SEQ ID N° 4, ou Cre-ER<sup>T2</sup> de séquence ID N° 6, ou Cre-ER<sup>T3</sup> de séquence ID N° 8,  
 25 ledit gène de fusion étant sous le contrôle du promoteur de la cytokératine K14 ;
- une ou des séquences d'ADN chromosomique d'intérêt dans leur contexte chromatinien naturel et encadrée(s) de site lox (« floxées »).

30 Selon un troisième mode préféré de réalisation de l'invention, l'organisme selon l'invention est

caractérisé en ce qu'au moins une des cellules de ladite souris comprend :

- un gène de fusion codant pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> de séquence SEQ ID N° 4, ou Cre-ER<sup>T2</sup> de séquence ID N° 6, ou Cre-ER<sup>T3</sup> de séquence ID N° 8, ledit gène de fusion étant sous le contrôle du promoteur de la protéine adipose 2 (aP2) ;
- une ou des séquences d'ADN chromosomique d'intérêt dans leur contexte chromatinien naturel et encadrée(s) de site lox (« floxées »).

Selon un quatrième mode préféré de réalisation de l'invention, l'organisme selon l'invention est caractérisé en ce qu'au moins une des cellules de ladite souris comprend :

- un gène de fusion codant pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> de séquence SEQ ID N° 4, ou Cre-ER<sup>T2</sup> de séquence ID N° 6, ou Cre-ER<sup>T3</sup> de séquence ID N° 8, ledit gène de fusion étant sous le contrôle du promoteur de l' $\alpha$ -1-antitrypsine.
- une ou des séquences d'ADN chromosomique d'intérêt dans leur contexte chromatinien naturel et encadrée(s) de site lox (« floxées »).

La présente invention concerne également des procédés de préparation d'un organisme métazoaire selon l'invention.

Un premier procédé de préparation consiste dans les étapes de :

- a) obtention d'une cellule souche embryonnaire (ES) modifiée par insertion de site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinase dans ladite (lesdites) séquence(s) d'ADN d'intérêt,



localisées dans un ou plusieurs chromosomes, par recombinaison homologue ;

- b) introduction de ladite cellule souche embryonnaire modifiée dans un embryon dudit organisme ;
- 5 c) développement dudit embryon jusqu'au stade d'un organisme adulte fertile ;
- d) croisement dudit organisme adulte fertile avec un organisme transgénique dont au moins une des cellules exprime ladite protéine de fusion et  
10 obtention des descendants issus dudit croisement ;  
et
- e) facultativement, sélection, parmi lesdits descendants, dudit organisme métazoaire.

Un second procédé de préparation consiste dans les  
15 étapes de :

- a) Obtention d'une cellule somatique modifiée par insertion de site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinase dans ladite (lesdites) séquence(s) d'ADN d'intérêt localisée(s) dans un  
20 ou plusieurs chromosome(s), par recombinaison homologue ;
- b) transfert du noyau de ladite cellule somatique modifiée dans le cytoplasme d'un oocyte receveur énucléé ;
- 25 c) développement de l'embryon obtenu à l'étape b) jusqu'au stade d'un organisme adulte fertile ;
- d) croisement dudit organisme adulte fertile avec un organisme transgénique dont au moins une des cellules exprime la protéine de fusion et  
30 obtention des descendants issus dudit croisement ;  
et

- e) facultativement, sélection, parmi les descendants dudit organisme métazoaire.

Par transfert du noyau ou transfert nucléaire, au sens de la présente invention, on entend désigner le  
5 transfert de noyau d'une cellule vivante donneuse de vertébré, d'un organisme adulte ou au stade fœtal, dans le cytoplasme d'une cellule receveuse énucléée de la même espèce ou d'une espèce différente. Le noyau transféré est reprogrammé pour diriger le développement  
10 des embryons clonés qui peuvent ensuite être transférés dans des femelles porteuses pour produire les fœtus et les nouveau-nés, ou utilisés pour produire des cellules de la masse cellulaire interne en culture. Différentes techniques de clonage nucléaire sont susceptibles  
15 d'être utilisées ; parmi celles-ci, il convient de citer celles qui font l'objet des demandes de brevet WO 95 17500, WO 97 07668, WO 97 07669, WO 98 30683, WO 99 01163, WO 99 37143.

Un troisième procédé de préparation consiste dans  
20 les étapes de :

- a) obtention d'une cellule souche embryonnaire (ES) modifiée par insertion de site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinase dans ladite (lesdites) séquence(s) d'ADN d'intérêt,  
25 localisée(s) dans un ou plusieurs chromosome(s), par recombinaison homologue ;
- b) introduction de ladite cellule souche embryonnaire modifiée dans un embryon dudit organisme ;
- c) développement dudit embryon ; et
- 30 d) introduction de ladite protéine de fusion dans au moins une cellule dudit embryon ou de l'organisme issu du développement dudit embryon.

Un quatrième procédé de préparation consiste dans les étapes de :

- a) Obtention d'une cellule somatique modifiée par insertion de site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinase dans ladite (lesdites) séquence(s) d'ADN d'intérêt localisée(s) dans un ou plusieurs chromosome(s), par recombinaison homologue ;
- b) transfert du noyau de ladite cellule somatique modifiée dans le cytoplasme d'un oocyte receveur énucléé ;
- c) développement dudit embryon ; et
- d) introduction de ladite protéine de fusion dans au moins une cellule dudit embryon ou dudit organisme issu du développement dudit embryon.

L'insertion des sites de reconnaissance spécifiques de la protéine recombinase, notamment du ou des sites loxP pour la recombinase Cre, dans la séquence d'ADN d'intérêt se fait de préférence par recombinaison homologue du gène comportant ledit fragment d'ADN à exciser ou inverser (deux sites loxP) ou respectivement insérer ou transloquer (un site loxP) avec un dit gène modifié comportant ledit fragment d'ADN à exciser flanqué en 5' et/ou 3' par le ou lesdits sites de reconnaissance de recombinase en fonction de l'application désirée, notamment les sites loxP.

Pour ce faire, le fragment d'ADN d'intérêt modifié peut être intégré par recombinaison homologue dans le génome des cellules dudit organisme avant, en même temps, ou après l'étape d'introduction de la protéine de fusion ou d'un vecteur de transfert, ou d'expression

de la protéine de fusion. De préférence, le fragment d'ADN d'intérêt est introduit dans des cellules embryonnaires pluripotentes (cellules ES) par la technique appropriée, telle par exemple  
5 l'électroporation, ou l'utilisation de vecteurs rétroviraux, la précipitation au phosphate de calcium, la lipofection.

Les constructions d'ADN destinées à la recombinaison homologue comprendront au moins une  
10 portion de la séquence d'ADN d'intérêt, notamment du gène ou de la séquence inter-génique d'intérêt, dans laquelle se trouvera introduite la ou les modifications génétiques souhaitées, telle que l'introduction d'au moins un site de reconnaissance de la recombinaise, et  
15 qui inclura des régions d'homologie avec le locus cible. Pour une utilisation facilitée, on introduit des marqueurs de sélection positif et/ou négatif (par exemple, le gène néo, conférant la résistance à l'antibiotique G418). Le marqueur de sélection utilisé  
20 pour permettre d'identifier les événements de recombinaison homologue peut être gênant, et peut être éliminé, si nécessaire, s'il est lui même encadré de sites de reconnaissance de recombinaise tels que des sites loxP (ou FRT). Ceci permet d'obtenir des souris  
25 dont la seule modification au niveau du locus modifié est l'insertion de sites de reconnaissance tels que loxP.

Les organismes métazoaires obtenus par les procédés de préparation présentés ci-dessus peuvent  
30 ensuite être traités avec un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique tel que le Tam et l'OHT. Dans les différents procédés et utilisations de

l'invention, la mise en présence desdites cellules dudit organisme avec ledit ligand synthétique se fait par administration par voie orale ou topique, ou par injection et notamment, par injection intraveineuse, 5 intramusculaire, intrarachidienne, intracérébrale, intrapéritonéale. Dans le cas d'un embryon, d'un fœtus ou d'un nouveau-né avant le sevrage, le traitement avec le ligand synthétique pourra être réalisé par administration à la mère. Lorsqu'il s'agit de cellules 10 en culture dérivées dudit organisme ledit ligand synthétique est de préférence ajouté au milieu de culture, ou injecté dans ladite cellule. Ce traitement ou cette mise en présence permet d'inactiver ou de modifier un gène ou une séquence inter-génique 15 d'intérêt à un moment déterminé (contrôle temporel) dans un tissu donné (contrôle spatial), et ainsi permettre d'étudier la fonction de ce gène ou de cette séquence à différents moments du développement. Ceci est particulièrement intéressant pour l'étude des gènes 20 qui sont indispensables au bon déroulement du développement embryonnaire et dont l'inactivation est létale à un stade précoce du développement.

La présente invention a donc également pour objet de fournir un procédé de recombinaison, notamment 25 d'excision, d'insertion, d'inversion, de translocation, conditionnelle au niveau de la séquence d'ADN d'intérêt dans laquelle est(sont) inséré(s) un ou plusieurs sites de reconnaissance de ladite protéine recombinase, ladite séquence d'ADN d'intérêt étant localisée dans un 30 ou plusieurs des chromosomes dudit génome de ladite cellule dudit organisme selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes de :

- (i) mise en présence d'au moins une cellule dudit organisme avec un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique ;
- (ii) induction de l'activité de la recombinaise de ladite protéine de fusion par ledit ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique.

La présente invention fournit donc un procédé de délétion conditionnelle d'un fragment d'ADN dans lequel on met en œuvre un procédé d'excision selon l'invention, et dans lequel ledit(lesdits) fragment(s) d'ADN à exciser est(sont) encadré(s) par deux sites de reconnaissance de protéine recombinaise orientés en répétition directe. En particulier, ledit fragment d'ADN peut être choisi de telle sorte que l'excision dudit fragment d'ADN a pour effet, l'inactivation dudit gène.

La présente invention fournit également un procédé d'obtention d'un organisme métazoaire à l'exception de l'homme, dont au moins une cellule possède un allèle d'un gène d'intérêt inactivé par un procédé de délétion conditionnelle et dont l'autre allèle dudit gène d'intérêt possède une mutation, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) obtention d'un organisme métazoaire dont au moins une cellule de la lignée germinale comporte ladite mutation dans un des allèles dudit gène d'intérêt ;
- b) croisement dudit organisme obtenu à l'étape a) avec un organisme selon l'invention ;
- c) sélection d'un descendant dont le génome comprend un gène d'intérêt dont un des allèles possède une mutation et l'autre allèle possède au moins deux

sites de reconnaissance de protéines recombinares orientés en répétition directe ; et

5 d) mise en œuvre du procédé de délétion conditionnelle, selon l'invention, du fragment d'ADN dudit allèle dudit gène d'intérêt qui est encadré par au moins deux sites de reconnaissance de protéine recombinase orientés en répétition directe ; et

10 e) obtention dudit organisme métazoaire dont le génome d'au moins une cellule comprend ledit gène d'intérêt dont un allèle est inactivé, et l'autre allèle possède une mutation somatique de préférence limitée, et de préférence dans des séquences exoniques et/ou régulatrices.

15 Un tel procédé permet d'étudier et d'analyser la fonction biologique de mutations autres que des délétions, et plus particulièrement des mutations observées dans des gènes dont le dysfonctionnement provoque une pathologie génétique récessive. Ce procédé  
20 est donc particulièrement adapté à l'obtention de modèles animaux transgéniques de pathologies génétiques humaines à transmission récessive, le modèle animal étant de préférence le modèle murin.

Les mutations sont de préférence des mutations  
25 ponctuelles ou limitées dans des exons ou des séquences régulatrices telles que des insertions, délétions, substitutions.

Selon un mode préféré de réalisation du procédé de recombinaison, et du procédé de délétion conditionnelle  
30 ou du procédé d'obtention d'un organisme métazoaire selon l'invention, les sites de reconnaissance spécifique de la protéine recombinase sont les sites

loxP et ladite protéine recombinase est la protéine Cre du bactériophage P1, ou l'un de ses variants.

Les organismes susceptibles d'être obtenus par la mise en œuvre des différents procédés précédents sont également compris dans la portée de l'invention. Ces organismes sont de préférence des animaux, et de manière préférée des rongeurs, tels que le rat et la souris, de préférence la souris.

De manière préférée, l'invention a pour objet une souris transgénique K5-Cre-ER<sup>T</sup> / RXR<sub>α</sub><sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR<sub>α</sub> peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopécie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

De manière préférée, l'invention a pour objet une souris transgénique K5-Cre-ER<sup>T2</sup> / RXR<sub>α</sub><sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR<sub>α</sub> peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopécie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

De manière préférée, l'invention a pour objet une souris transgénique K5-Cre-ER<sup>T3</sup> / RXR<sub>α</sub><sup>L2/L2</sup> dont le gène



RXR $\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité  
 5 anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopecie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

De manière préférée, l'invention a pour objet une  
 10 souris transgénique K14-Cre-ER<sup>T</sup> / RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR $\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité  
 15 anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopecie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

De manière préférée, l'invention a pour objet une  
 20 souris transgénique K14-Cre-ER<sup>T2</sup> / RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR $\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité  
 25 anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopecie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

De manière préférée, l'invention a pour objet une  
 30 souris transgénique K14-Cre-ER<sup>T3</sup> / RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> dont le gène

RXR $_{\alpha}$  peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité  
 5 anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopecie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

De manière préférée, l'invention a pour objet une  
 10 souris transgénique  $\alpha$ AT-Cre-ER<sup>T</sup> / RXR $_{\alpha}$ <sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR $_{\alpha}$  peut être sélectivement inactivé dans les hépatocytes par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique  
 15 entraînant chez ladite souris notamment une altération de la prolifération des hépatocytes.

De manière préférée, l'invention a pour objet une souris transgénique  $\alpha$ AT-Cre-ER<sup>T2</sup> / RXR $_{\alpha}$ <sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR $_{\alpha}$  peut être sélectivement inactivé dans les  
 20 hépatocytes par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique entraînant chez ladite souris notamment une altération de la prolifération des hépatocytes.

25 De manière préférée, l'invention a pour objet une souris transgénique  $\alpha$ AT-Cre-ER<sup>T3</sup> / RXR $_{\alpha}$ <sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR $_{\alpha}$  peut être sélectivement inactivé dans les hépatocytes par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un  
 30 ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique

entraînant chez ladite souris notamment une altération de la prolifération des hépatocytes.

De manière préférée, l'invention a pour objet une souris transgénique  $\text{aP2-Cre-ER}^T$  /  $\text{RXR}_\alpha^{L2/L2}$  dont le gène  $\text{RXR}_\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les adipocytes par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique entraînant chez ladite souris une altération du métabolisme des lipides dans les adipocytes et/ou un diabète.

De manière préférée, l'invention a pour objet une souris transgénique  $\text{aP2-Cre-ER}^{T2}$  /  $\text{RXR}_\alpha^{L2/L2}$  dont le gène  $\text{RXR}_\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les adipocytes par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique entraînant chez ladite souris une altération du métabolisme des lipides dans les adipocytes et/ou un diabète.

De manière préférée, l'invention a pour objet une souris transgénique  $\text{aP2-Cre-ER}^{T3}$  /  $\text{RXR}_\alpha^{L2/L2}$  dont le gène  $\text{RXR}_\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les adipocytes par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique entraînant chez ladite souris une altération du métabolisme des lipides dans les adipocytes et/ou un diabète.

De préférence, ledit gène  $RXR_\alpha$  de ladite souris est inactivé par la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention.

La présente invention et notamment l'organisme  
5 métazoaire et les cellules qui en sont dérivées sont particulièrement utiles pour l'analyse ou l'étude de la fonction biologique d'une séquence d'ADN d'intérêt, qu'elle soit génique ou inter-génique dans son environnement chromatinien naturel. C'est la raison  
10 pour laquelle, il est également dans la portée de la présente invention de fournir un procédé d'analyse ou d'étude de la fonction biologique d'une séquence d'ADN d'intérêt, notamment d'un gène ou d'une séquence inter-génique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes  
15 de :

- (i) mise en présence d'un organisme selon l'invention ou de cellules isolées dudit organisme avec un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique ;
- 20 (ii) facultativement l'induction de l'expression de ladite protéine de fusion ;
- (iii) mise en évidence de l'événement de recombinaison catalysé par l'activité recombinaise de ladite protéine de fusion ;
- 25 (iv) étude ou analyse biochimique et/ou physiologique et/ou phénotypique et/ou comportementale, de ladite cellule ou dudit organisme.

Les analyses phénotypiques et comportementales de l'organisme selon l'invention avant ou après induction  
30 de la recombinaison somatique sont réalisées en utilisant les techniques connues de l'homme de l'art.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un organisme selon l'invention ou de cellules dérivées dudit organisme pour réaliser une recombinaison site-spécifique spatio-temporellement  
5 contrôlées de ladite séquence d'ADN d'intérêt dans son environnement chromatinien naturel, avec une efficacité d'au moins 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, en présence de ligand synthétique dans les cellules dudit organisme exprimant ladite protéine de  
10 fusion et avec une efficacité au moins inférieure à 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01%, ou nulle en absence de ligand synthétique ou en présence de ligand naturel dans les cellules dudit organisme exprimant ladite protéine de fusion.

15 Selon un mode préféré, ladite recombinaison est réalisée dans l'épiderme, et plus précisément dans les kératinocytes, dans les adipocytes, ou dans les hépatocytes.

La présente invention a également pour objet son  
20 procédé de criblage de composés susceptibles d'être utilisés comme médicament pour le traitement préventif et/ou curatif de pathologies associées à une altération de l'expression (dans le cas notamment de séquence d'ADN inter-génique) et/ou de la fonction (dans le cas  
25 de séquence d'ADN génique) de ladite séquence d'ADN d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comporte l'étape d'administration dudit composé dans un organisme selon l'invention.

Cet organisme peut ainsi être utilisé pour le  
30 criblage de composés susceptibles de constituer un principe actif d'un médicament destiné au traitement de pathologies associées à une altération de l'expression

et/ou de la fonction de ladite séquence d'ADN d'intérêt.

Ainsi, la présente invention a pour objet de fournir un procédé de criblage de composés susceptibles d'être utilisés comme médicament pour le traitement préventif et/ou curatif de l'alopecie et/ou de l'hperprolifération des kératinocytes et/ou des réactions inflammatoires de la peau, caractérisé en ce qu'il comporte l'étape d'administration dudit composé dans une souris selon l'invention.

La présente invention a également pour objet de fournir un procédé de criblage de composés susceptibles d'être utilisés comme médicament pour favoriser notamment la régénération hépatique, caractérisé en ce qu'il comporte l'étape d'administration dudit composé dans une souris selon l'invention.

La présente invention a également pour objet de fournir un procédé de criblage de composés susceptibles d'être utilisés comme médicament pour le traitement préventif et/ou curatif du diabète et/ou pour le traitement de l'altération du métabolisme des lipides, notamment de l'obésité, caractérisé en ce qu'il comporte l'étape d'administration dudit composé dans une souris selon l'invention.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre.

Figure 1 : Inactivation du gène  $RXR_{\alpha}$  dans l'épiderme de souris adulte médiée par la Cre-ER<sup>T</sup> et Cre-ER<sup>T2</sup>, et induite par le Tamoxifène.

Figure 1A : Représentation schématique du locus génomique sauvage de  $RXR_{\alpha}$  (+), de l'allèle  $RXR_{\alpha}$  L2 floxé, de l'allèle  $RXR_{\alpha}$  L<sup>-</sup> obtenu après une excision médiée par la Cre de l'exon 4 (codant pour le domaine de liaison à l'ADN), et de l'allèle nul  $RXR_{\alpha}$  (-) (Kastner et al., 1994). Les boîtes noires indiquent les exons (E2 - E4). Les sites de restriction enzymatique et la position de la sonde X4 sont indiqués. Les tailles des fragments BamHI sont indiquées en kilobases (kb) : BamHI ; C, ClaI ; E, EcoRI H, HindIII ; S, SpeI ; X, XbaI. Les pointes de flèche dans les allèles L2 et L<sup>-</sup> indiquent les sites Lox P.

Figure 1B : L'obtention d'allèles  $RXR_{\alpha}$  L<sup>-</sup> médié par K5-Cre-ER<sup>T</sup> induit par le Tamoxifène est illustrée par l'analyse en Southern blot de l'ADN isolé de l'épiderme, six semaines (lignes 1 à 3) ou douze semaines (lignes 4 à 6) après la première injection de Tamoxifène (1 mg) (AFT : « after first Tamoxifen treatment »). Le génotype des souris est tel qu'indiqué, et les fragments digérés par BamHI correspondant aux allèles  $RXR_{\alpha}$ (+), L2, L<sup>-</sup>, (-) sont décrits.

25

Figure 1C : Sélectivité tissulaire de l'inactivation de  $RXR_{\alpha}$  médié par Cre-ER<sup>T</sup>. Les allèles sauvages (+), L2, L<sup>-</sup> sont identifiés par PCR à partir d'ADN extrait de différents organes de souris K5-Cre-ER<sup>T(tg/0)</sup>/ $RXR_{\alpha}$  L2/+,

douze semaines après le premier traitement au Tamoxifène.

**Figure 1D :** L'obtention d'allèles  $RXR_{\alpha}$   $L^{-}$  médiés par  
 5  $K14-Cre-ER^{T2}$  induit par le Tamoxifène dans l'épiderme  
 de la souris adulte est illustré par une analyse PCR de  
 l'ADN génomique extrait de l'épiderme (E) et du derme  
 (D) isolé deux semaines après la première injection de  
 Tamoxifène (0,1 mg) (+) ou du véhicule (huile) (-). Le  
 10 génotype des souris est indiqué et les fragments PCR  
 correspondant aux allèles  $RXR_{\alpha}(+)$ ,  $L2$  et  $L^{-}$  sont  
 indiqués.

**Figure 2 :** Anomalies générées par l'inactivation de  
 15  $RXR_{\alpha}$  médiée par  $K5-Cre-ER^T$  et  $K14-Cre-ER^{T2}$  induits par  
 le Tamoxifène, dans la peau de souris adulte.

**Figure 2A :** Vue ventrale d'une souris femelle  
 « mutante » (mt)  $K5-Cre-ER^{T(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/-}$  (à gauche) et  
 20 d'une souris femelle « contrôle » (ct)  $K5-Cre-ER^{T(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/+}$  (à droite), seize semaines après la  
 première injection au Tamoxifène (1 mg de  
 Tamoxifène/injection).

25 **Figure 2B :** Vue dorsale des mêmes animaux.

**Figure 2C :** Agrandissement de la région ventrale de la  
 souris femelle « mutante » (mt)  $K5-Cre-ER^{T(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/-}$ ,  
 avec la flèche indiquant un des kystes visibles sous la  
 30 surface de la peau.



**Figure 2D :** Vue dorsale de la souris femelle « mutante » (mt) K5-Cre-ER<sup>T(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/-</sup>, vingt-huit semaines après le début du traitement au Tamoxifène. La flèche indique une lésion mineure de la peau.

5

**Figures 2E-H :** Analyse histologique. Sections histologiques de 2  $\mu$ m d'épaisseur de la peau ventrale de souris « contrôle » (E et G) et « mutante » (F et H), seize semaines après le début du traitement. Des  
 10 follicules pileux (hf), des utricules (u) et des kystes dermiques (dc) sont indiqués. Les pointes de flèches dans (H) indiquent les cellules de Langerhans, dont le nombre est augmenté plusieurs fois dans l'épiderme des souris mutantes. Notez-en (F) et en (H) la cellularité  
 15 accrue dans le derme en dessous de l'épiderme interfolliculaire hyperprolifératif. Echelle (dans E) E et F = 60  $\mu$ m ; G et H = 12  $\mu$ m.

**Figures 2I, J :** Immunohistochimie de la kératine 6 (K6) sur des sections de peau de souris « contrôle » (I) et  
 20 de souris « mutante » (J), seize semaines après le premier traitement au Tamoxifène. La couleur rouge correspond au marquage par l'anticorps dirigé contre K6, et la couleur Cyan correspond à une coloration au  
 25 DAPI. K6 est normalement exprimé dans la partie externe de la gaine de la racine du follicule pileux (hf) mais pas dans l'épiderme (I) et est exprimé anormalement dans l'épiderme hyperprolifératif de souris « mutante » (J). Echelle (dans I) I = 25  $\mu$ m. Les flèches dans E à J  
 30 indiquent la jonction derme-épiderme.

- Figures 2K, L : Apparence de la peau d'une souris femelle « mutante »  $K14-Cre-ER^{T2(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/L2}$ . (K) agrandissement de la région ventrale, seize semaines après le début du traitement au Tamoxifène (0,1 mg par injection) ; la flèche blanche indique un kyste et la flèche noire indique un utricule contenant des mélanosomes. (L) vue dorsale du même mutant. La flèche indique une des lésions de la peau associée avec une région sans poil.
- 10 Figure 3 : Similitudes et différences entre les anomalies de la peau présentes chez une souris double « mutante »  $K5-Cre-ER^{T(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/L2}/RXR_{\beta}^{-/-}$  induite au Tamoxifène et une souris VDR « nulle ».
- 15 Figures 3A, E : souris  $K5-Cre-ER^{T(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/L2}/RXR_{\beta}^{-/-}$  dix-huit semaines après le premier traitement au Tamoxifène (1 mg de Tamoxifène par injection) (A) et souris  $VDR^{-/-}$  âgée de quatorze semaines (E). Les flèches en (A) indiquent les lésions de la peau. (B, C) et (F, G) : analyse histologique de sections de 2  $\mu m$  d'épaisseur de la peau dorsale des animaux présentés en (A) et (E) respectivement. Echelle (dans G) : B et F = 60  $\mu m$  ; C et G = 12  $\mu m$ .
- 25 Figures 3D, H : Immunohistochimie de la kératine 6 (K6) sur des sections de peau de souris prélevées sur les animaux présentés en (A) et (E) respectivement. Notez que K6 est exprimé dans l'utricule, mais pas dans l'épiderme de la peau des souris  $VDR^{-/-}$ , alors que K6 est exprimé dans tout l'épiderme hyperprolifératif des souris « double-mutantes »  $RXR_{\alpha}/RXR_{\beta}$  (D). Utricule (U),
- 30

kyste dermique (dc). Les flèches en (B-H) indiquent la jonction derme-épiderme. Echelle (dans H) : D et H = 25  $\mu$ m.

- 5 Figure 4 : Inactivation ciblée sélective du gène SNF2 $\beta$  dans l'épiderme de souris adulte.

Figure 4A : Représentation schématique des allèles de SNF2 $\beta$  de type sauvage (+), L3, L2+ et L-.

- 10 La taille des segments d'ADN révélés par la sonde 5', après digestion enzymatique de l'ADN génomique par BamHI est indiquée. L'allèle L3 dans les cellules ES a été obtenu par recombinaison homologue en utilisant une  
15 F9 dans Sumi-Chinose et al., 1997.

#### Figure 4B

- Des souris K14-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/SNF2 $\beta$ <sup>L2/L2</sup> et K14-Cre-ER<sup>T2(0/0)</sup>/SNF2 $\beta$ <sup>L2/L2</sup> de huit semaines ont été traitées au  
20 Tamoxifène (Tam) pendant cinq jours à raison de 0,1 mg/jour ou avec de l'huile (-). Des biopsies de queue ont été prélevées, le derme et l'épiderme séparés, l'ADN génomique préparé, digéré par BamHI, séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, et transféré sur des  
25 membranes de nylon, qui ont été hybridées avec la sonde 5' radiomarquée. Des autoradiographies sont présentées.

Figure 5 : Inactivation ciblée sélective du gène RXR $\alpha$  dans les adipocytes.

Des souris transgéniques aP2-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup> exprimant Cre-ER<sup>T2</sup> sous le contrôle du promoteur murin aP2, qui est sélectivement actif dans les adipocytes (Ross et al., 1990), ont été croisées avec des souris  
 5 RXR $\alpha$ <sup>L2/+</sup> pour produire des souris aP2-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup> / RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup>.

Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris RXR $\alpha$ <sup>+/-</sup> (Kastner et al., 1994) pour produire des souris aP2-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup> / RXR $\alpha$ <sup>L2/-</sup>. De telles souris,  
 10 âgées de quatre semaines, ont été traitées (+) ou non (-) au Tamoxifène (1 mg/jour) pendant cinq jours, et le tissu adipeux prélevé un mois après la dernière injection de Tamoxifène. L'ADN a été extrait du tissu adipeux, ou après séparation des adipocytes (adipocytes  
 15 purifiés à 80%) du tissu conjonctif et vaisseaux sanguins (non adipocytes). Après digestion par BamHI, les allèles de RXR $\alpha$  ont été analysés par Southern blot. Un autoradiogramme est présenté. Aucune excision n'est observée dans les adipocytes purifiés ou le tissu  
 20 adipeux de souris non traitées au Tamoxifène (Tam). En revanche, dans le tissu adipeux et les adipocytes de souris traitées au Tamoxifène, une excision est observée qui se caractérise par l'apparition d'une bande à 8,5 kb correspondant à l'allèle L<sup>-</sup>.

25

Figure 6 : Analyse phénotypique de souris après mutagenèse somatique conditionnelle de RXR $\alpha$  dans les adipocytes.

Le poids des souris contrôles aP2-Cre-ER<sup>T2tg/0</sup>RXR $\alpha$ <sup>L2/+</sup> (CT) et aP2-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/-</sup> (mutantes;KO) a été déterminé une fois par semaine. (A) Chaque groupe d'animaux était composé de 10 à 15 mâles. 5 Les animaux étaient nourris soit avec de l'alimentation normale (AN) ou enrichie en graisses et en glucose (AR). (B) Le poids du tissu adipeux sous-cutané de souris CT et KO de 6 mois, nourris avec de l'AN ou de l'AR. (C) Cryocoupes de 10  $\mu$ m de tissu adipeux sous- 10 cutané de souris CT (a et c) et KO (b et d) de 6 mois, nourries avec de l'AN (a et b) ou AR (c et d). Echelle; 160  $\mu$ m. Les niveaux de triglycérides (D), de glucose (E) et d'insuline (F) ont été déterminés sur du sérum d'animaux CT et KO de 4 à 5 mois, nourris avec une AN 15 ou AR. Le dosage du glucose a été réalisé après une mise à jeun des animaux de 12 heures, \*p < 0,05.

**Figure 7 : Inactivation ciblée sélective du gène RXR $\alpha$  dans les hépatocytes murins.**

20 Pour invalider le gène RXR $\alpha$  sélectivement dans les hépatocytes, des souris  $\alpha$ AT-Cre-ER<sup>T(tg/0)</sup> qui expriment Cre-ER<sup>T</sup> sous le contrôle du promoteur du gène de l' $\alpha$ -1-antitrypsine ( $\alpha$ AT) dans environ 50% des hépatocytes (Imai et al., 2000) ont été croisées avec des souris 25 RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> pour produire des souris  $\alpha$ AT-Cre-ER<sup>T(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup>. De telles souris, âgées de trois mois, ont été traitées au Tamoxifène (1 mg/jour) pendant cinq jours, et le cœur et le foie prélevés sept jours après la première injection de Tamoxifène (jour

7), sur respectivement un et trois animaux. Le cœur et le foie ont également été prélevés sur respectivement un et trois animaux du même génotype sans traitement au Tamoxifène (Jour 0). L'ADN a été extrait de ces tissus, et après digestion par BamHI, les allèles de  $RXR_{\alpha}$  ont été analysés par Southern blot. Un autoradiogramme est présenté. Aucune excision n'est observée dans le cœur au jour 0 ou 7, ou dans le foie au jour 0. En revanche, une excision est observée dans le foie de souris sept jours après le traitement au Tamoxifène ; cette excision se matérialise par l'apparition d'une bande à 8,5 kb sur l'autoradiogramme, correspondant à l'allèle  $L^{-}$ .

15 **Figure 8 : Recombinaison site-spécifique de  $RXR_{\alpha}$  dans le foie.**

L'excision de segments d'ADN médiée par Cre- $ER^T$  a été déterminée par «southern blot», effectué avec de l'ADN extrait de cœur et de foie de souris  $\alpha AT$ -Cre- $ER^{T(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/L2}$ , prélevés sur différents animaux avant les injections de tamoxifène (jour 0) ou 7, 30 ou 90 jours après la dernière injection de Tamoxifène.

Les pistes 15-17 correspondent à de l'ADN isolé de foies d'animaux 7 jours après hépatectomie partielle (HP), réalisée après l'injection de Tamoxifène. La position des allèles  $RXR_{\alpha}^{L2}$  et  $L^{-}$  est indiquée.

**Figure 9 : Expression des recombinaases Cre- $ER^{T2}$  et Cre- $ER^{T3}$  dans la couche basale de l'épiderme.**

Immunohistochimie de la recombinaise Cre chimérique sur des sections de l'épiderme de souris K5-Cre-ER<sup>T2</sup> et K5-Cre-ER<sup>T3</sup>, traitées soit avec 1 mg ou 0,1 mg d'OHT (4-hydroxyTamoxifène). La couleur rouge correspond au marquage par l'anticorps anti-Cre dirigé contre la protéine recombinaise Cre, et la couleur Cyan correspond au DAPI colorant les noyaux cellulaires. Cre-ER<sup>T2</sup> et Cre-ER<sup>T3</sup> sont localisés dans les noyaux cellulaires de la couche basale. (Notez que la superposition des couleurs rouge et cyan se traduit par une coloration violette).

Figure 10 : Translocation nucléaire de Cre-ER<sup>T2</sup> et Cre-ER<sup>T3</sup> suite à un traitement de deux jours à différentes doses d'OHT.

Immunohistochimie de la recombinaise Cre chimérique sur des sections de l'épiderme de souris K5-Cre-ER<sup>T2</sup> et K5-Cre-ER<sup>T3</sup> traitées soit avec 0,1 mg, 0,01 mg ou 0,001 mg d'OHT et analysé deux jours (J 2) après le début du traitement (J 0). La couleur rouge correspond au marquage par l'anticorps anti-Cre dirigé contre la protéine Cre, et la couleur Cyan correspond au DAPI. Cre-ER<sup>T2</sup> et Cre-ER<sup>T3</sup> sont localisés dans les noyaux cellulaires de la couche basale. Cre-ER<sup>T3</sup> est présent dans une plus grande fraction de ceux-ci que Cre-ER<sup>T2</sup>, aux différentes doses d'OHT. A la dose de 0,001 mg environ 1/3 des noyaux sont fortement marqués par des anticorps anti-Cre dans la couche basale de l'épiderme de souris K5-Cre-ER<sup>T3</sup>, alors qu'aucun noyau positif

n'est observé dans la peau de souris K5-Cre-ER<sup>T2</sup>.  
(Notez que la superposition des couleurs rouge et cyan se traduit par une coloration violette).

- 5 Figure 11 : Comparaison de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase dans l'épiderme de queue de souris K5-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/Rosa<sup>fl/+</sup> et K5-Cre-ER<sup>T3(tg/0)</sup>/Rosa<sup>fl/+</sup> induite par différentes doses d'OHT.

10 Activité de la  $\beta$ -galactosidase sur des sections de l'épiderme de la queue de souris K5-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/Rosa<sup>fl/+</sup> et K5-Cre-ER<sup>T3(tg/0)</sup>/Rosa<sup>fl/+</sup> traitées avec 1 mg, 0,1 mg, 0,01 mg et 0,001 mg d'OHT. Les analyses sont réalisées au quinzième jour après le début du traitement (J0).

- 15 Les niveaux d'excision induits par 1 et 0,1 mg de OHT sont similaires pour les deux lignées ; en revanche, l'excision est plus efficace dans les souris K5-Cre-ER<sup>T3</sup> que K5-Cre-ER<sup>T2</sup> aux doses de 0,01 et 0,001 mg d'OHT.

20



## EXEMPLES

### 1) MATERIELS ET METHODES

#### 5 1.1 - Lignées transgéniques

Les lignées de souris  $RXR_{\alpha}^{+/-}$ ,  $VDR^{-/-}$ , et  $K5-Cre-ER^T$  ont été décrites précédemment dans Yoshizawa et al. (1997), Kastner et al. (1994), et Indra et al. (1999).

10 Le transgène  $K14-Cre-ER^{T2}$  a été construit en remplaçant la région promotrice K5 du vecteur  $pK5-Cre-ER^{T2}$  (Indra et al., 1999) par le fragment d'ADN  $Sall$  de la région promotrice/activatrice de 2 kb du gène de la  
15 S. Werner). Les souris transgéniques ont été générées conformément à l'article de Indra et al. (1999).

Le transgène  $aP2-Cre-ER^{T2}$  a été construit comme suit : un fragment de 5.4 kb contenant le promoteur  $aP2$  a été amplifié par PCR à partir d'ADN génomique de  
20 souris à l'aide du LA-PCR kit (Perkin-elmer, New Jersey) , avec les oligonucléotides 5'-ATACGCGGCCGCGAATTCCAGCAGGAATCAGGTAGCT-3' (Séquence ID N°13) et 5'-ATAGCGCCGGCGCTGCAGCACAGGAGGGTGCTATGAG-3' (Séquence ID N°14). Après avoir rendu les extrémités de  
25 ce fragment franches suite à l'action de la T4 polymérase, il a été cloné au niveau du site  $Sall$  de  $pGS-Cre-ER^{T2}$  (Indra et al., 1999), dont les extrémités ont également été rendues franches suite à l'action de la T4 polymérase. Le fragment  $NotI$  de 8.3 kb a été  
30 isolé de ce plasmide, purifié et injecté dans des zygotes F1 (C57BL/6 x SJL) à la concentration de 4

ng/ml, et les souris portant le transgène aP2-Cre-ER<sup>T2</sup> ont été identifiées selon Feil et al., (1996) et Imai et al., (2000).

## 5 1.2 - Génotypage des allèles RXR $\alpha$

L'ADN génomique est isolé de tissus selon le protocole décrit dans l'article d'Indra et al. (1999).

L'épiderme est séparé du derme après un traitement  
 10 de la peau de la queue avec l'enzyme dispase (4 mg/ml dans du PBS, GIBCO-BRL) pendant 1 à 2 heures à température ambiante. Le génotypage des cellules RXR $\alpha$  est réalisé par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) en utilisant les amorces ZO 243 (5'-TCC TTC ACC  
 15 AAG CAC ATC TG-3') (SEQ ID N° 9) (localisé dans l'exon 3) et ZO 244 (5'-TGC AGC CCT CAC AAC TGT AT-3') (SEQ ID N° 10) (localisé dans l'exon 4) pour les allèles L2 et sauvage (+) ; ces réactions d'amplification génèrent pour l'allèle L2 un fragment de 700 pb et pour l'allèle  
 20 sauvage (+) un fragment de 650 pb.

Les amorces ZO 243 et UD 196 (5'-CAA CCT GCA CTT GTC ACT TAG-3') (SEQ ID N° 11) (localisé dans l'intron entre les exons 4 et 5) ont été utilisées dans une réaction de polymérisation en chaîne pour mettre en  
 25 évidence l'allèle L<sup>-</sup> ; cette réaction d'amplification génère un fragment de 400 pb.

Les amorces ZO 243 et RU 178 (5'-ATG TTT CAT AGT TGG ATA TC-3') (SEQ ID N°12) localisé dans la cassette  
 30 en chaîne pour mettre en évidence l'allèle (-) ; cette réaction de PCR génère un fragment de 500 pb.

Pour les analyses utilisant le transfert d'ADN (Southern blotting), l'ADN génomique est digéré avec BamHI et la sonde utilisée est la sonde X4 (fragment BamHI-XbaI de 3 kb du gène RXR $\alpha$ ) (Metzger et al., 5 1995).

### 1.3 - Traitement au Tamoxifène

Des solutions de Tamoxifène (Sigma) sont préparées  
10 selon le protocole décrit par Metzger et Chambon  
(2000). 1 mg de Tamoxifène dissout dans 100  $\mu$ l d'huile  
de tournesol est injecté intrapéritonéalement dans une  
souris transgénique K5-Cre-ER<sup>T</sup> pendant cinq jours  
consécutifs, puis encore trois jours consécutifs, deux,  
15 quatre et six semaines plus tard. Les souris  
transgéniques K14-Cre-ER<sup>T2</sup> sont injectées  
intrapéritonéalement avec 0,1 mg de Tam dissout dans  
100  $\mu$ l d'huile de tournesol pendant cinq jours  
consécutifs, tandis que les souris  $\alpha$ P2-Cre-ER<sup>T2</sup> et  $\alpha$ AT-  
20 Cre-ER<sup>T</sup> sont traitées avec 1 mg de Tam.

### 1.4 - Analyses histologiques

Les biopsies de peau d'animaux de même âge et de  
25 même sexe ont été réalisées au niveau des mêmes  
endroits du corps.

Les échantillons de peau sont fixés dans le  
glutaraldéhyde (2,5% dans un tampon cacodylate à 0,1 M  
pH 7,2) pendant la nuit à 4°C puis post-fixés avec du  
30 tétroxyde d'osmium à 1% dans un tampon cacodylate  
pendant 1 heure à 4°C. Les tissus sont déshydratés avec

des concentrations croissantes d'alcool puis recouverts de EPON 812. Des sections semi-fines de 2  $\mu\text{m}$  sont ensuite colorées avec du bleu de toluidine.

## 5 1.5 - Immunochimie

Après fixation dans du paraformaldéhyde à 2%, des sections congelées de 10  $\mu\text{m}$  sont bloquées dans 5% de sérum de chèvre normal (Vector Laboratories) incubées  
 10 avec l'anticorps polyclonal anti-MK6 de lapin (Babco). Après lavage dans du PBS/0,1% Tween 20, les sections sont incubées avec l'anticorps IgG anti-lapin d'âne conjugué au CY3 (Jackson Immuno Research) puis monté dans le milieu Vectashield (Vector Laboratories)  
 15 contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride ; Boehringer Mannheim) (Brocard et al., 1997). Les anticorps anti-Cre sont utilisés selon Indra et al. (1999).

## 20 1.6 - Histologie

Les échantillons de tissu adipeux sont prélevés sur des animaux perfusés à la PFA, fixés à l'aide de formaldéhyde (20% dans du PBS), puis congelés dans de l'OCT (Tissue-Tek compound, Sakura). Des cryocoupes de  
 25 10  $\mu\text{m}$  sont colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine.

Le foie est prélevé sur des animaux, rincé dans du PBS, fixé dans une solution de Boin, puis inclus dans de la paraffine. Des coupes de 6  $\mu\text{m}$  sont colorées avec  
 30 l'hématoxyline et de l'éosine.

### 1.7 - Dosage de paramètres sanguins

Le dosage des triglycérides et du cholestérol est réalisé selon Peters et al. (1997), avec des réactifs de Boehringer Mannheim. Le dosage de l'insuline et du glucose sont réalisés respectivement avec la trousse de Crystal Chem Inc. et des glucofilms (Bayer Corp, USA).

### 2) Premier exemple : Inactivation ciblée du gène $RXR_{\alpha}$ dans l'épiderme de souris adulte.

Pour inactiver  $RXR_{\alpha}$  dans l'épiderme, les inventeurs ont construit une souris portant des allèles  $RXR_{\alpha}^{L2}$  floxés (« floxed ») (figure 1A) et ont utilisé la lignée de souris transgéniques K5-Cre-ER<sup>T</sup> dans lesquelles le Tamoxifène (Tam) induit efficacement la recombinaison médiée par Cre dans les kératinocytes de la couche basale (Indra et al., 1999). Le croisement de la souris K5-Cre-ER<sup>T(tg/tg)</sup>/ $RXR_{\alpha}^{L2/L2}$  avec une souris  $RXR_{\alpha}^{+/-}$  (figure 1A) (Kastner et al., 1994) ou avec une souris  $RXR_{\alpha}^{L2/+}$  permet d'obtenir des souris hémizygotes (tg/0) « pro-mutantes » (PM) pour le transgène K5-Cre-ER<sup>T</sup> qui portent soit un allèle  $RXR_{\alpha}^{L2}$  et un allèle  $RXR_{\alpha}$  nul (génotype : K5-Cre-ER<sup>T(tg/0)</sup>/ $RXR_{\alpha}^{L2/-}$ ), soit deux allèles L2 (génotype K5-Cre-ER<sup>T(tg/0)</sup>/ $RXR_{\alpha}^{L2/L2}$ ). Des souris PM âgées de quatorze semaines ont été traitées au Tamoxifène (cinq jours, 1 mg/jour), puis traitées à nouveau deux, quatre et six semaines après. Six à douze

semaines après le premier traitement au Tamoxifène (« AFT : After First Tamoxifen Treatment »), presque la totalité des allèles  $RXR_{\alpha}^{L2}$  (>80%) a été convertie en allèle  $RXR_{\alpha}^{L-}$  dans l'épiderme isolé de souris portant un  
 5 allèle floxé (figure 1B, lignes 2, 3, 5 et 6) ou deux allèles floxés (figure 1B, lignes 1 et 4).

Comme attendu (Indra et al. (1999)), aucune excision n'est observée dans les souris traitées uniquement avec l'huile qui a servi à véhiculer le  
 10 Tamoxifène ; l'excision médiée par la Cre de l'exon 4 de  $RXR_{\alpha}$  est en outre restreinte à la peau et à l'autres organes qui possèdent des épithelia dans lesquels le promoteur K5 est actif (c'est-à-dire : la langue, la glande salivaire, l'œsophage, figure 1C).

15 De manière intéressante, une perte de poil (alopécie) a été observée six à sept semaines après le premier traitement au Tamoxifène dans la région ventrale de la souris ; ceci n'a pas été observé chez les souris traitées avec de l'huile seule sans  
 20 Tamoxifène, ou chez les souris « contrôle » de la même portée traitées au Tamoxifène ( $K5-Cre-ER^{T(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/+}$ ).

Douze à seize semaines après la première injection, de larges régions ventrales et de plus petites régions dorsales de la peau de la souris  
 25 avaient perdu leur poil (figure 2A et B) et des kystes qui s'agrandissent et qui apparaissent sur tout le corps avec le temps sont également visibles sous la surface de la peau (figure 2C).

Plus l'âge augmente (> vingt semaines après la  
 30 première injection de Tamoxifène), des lésions

mineures, qui ne sont pas causées par des combats, apparaissent dans des régions sans poil de la peau du dos, des joues et de la face postérieure des oreilles (figure 2D).

5        Seize semaines après le premier traitement au Tamoxifène, l'histologie des régions ventrales et dorsales sans poil a montré une dégénérescence des follicules pileux résultant dans l'apparition d'utricules et de kystes dermiques (Sundberg et King, 10 1996) (figure 2 - comparer E et F). L'épiderme interfolliculaire est hyperplastique avec une augmentation de l'incorporation de BrdU et une expression accrue du marqueur de prolifération Ki67.

15        La cellularité dermique est augmentée et les capillaires sont dilatés (comparer les figures 2E et 2G avec 2F et 2H) en dessous de l'épiderme épaissi, reflétant ainsi une réaction inflammatoire. La kératine 6 (K6), normalement exprimée de manière sélective dans la partie externe de la gaine de la racine du follicule pileux (ORS : Hair Follicle Outer Root Sheath) est 20 également exprimée dans l'épiderme interfolliculaire hyperprolifératif (figure 2I et J), indiquant une anomalie de la différenciation terminale des kératinocytes (Porter et al., 1998). Toutes ces 25 anomalies sont moins sévères et/ou apparaissent plus tardivement chez les mâles que chez les femelles.

      Pour augmenter l'efficacité de la recombinaison médiée par la Cre et induite par le Tamoxifène, les inventeurs ont construit des lignées transgéniques de 30 souris K14-Cre-ER<sup>T2</sup> dans laquelle le promoteur K14 sélectif de la couche basale (Vassar et al., 1989) dirige l'expression de Cre-ER<sup>T2</sup> dont l'activité peut

être induite par un traitement plus doux au Tamoxifène (0,1 mg pendant cinq jours) (Indra et al., 1999).

Des souris K14-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> ont été traitées simultanément avec des souris « contrôle »  
 5 K14-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/+</sup>, K14-Cre-ER<sup>T2(0/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/+</sup> et K14-Cre-ER<sup>T2(0/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup>, provenant de la même portée.

En deux semaines, les allèles RXR $\alpha$ <sup>L2</sup> ont été entièrement convertis en allèle RXR $\alpha$ <sup>L-</sup> dans l'épiderme (figure 1D, lignes 1 et 7), mais pas dans le derme  
 10 (figure 1D, lignes 2 et 8) de souris transgéniques exprimant K14-Cre-ER<sup>T2</sup>, démontrant ainsi l'efficacité accrue de Cre-ER<sup>T2</sup> pour médier, lors d'un traitement au Tamoxifène, la mutation somatique sélective de RXR $\alpha$  floxé dans l'épiderme.

15 Aucune conversion de L2 vers L- n'est apparue dans les contrôles dépourvus de transgène K14-Cre-ER<sup>T2</sup> (figure 1D, lignes 5, 6, 11 et 12) ou non traités au Tamoxifène (figure 1D, lignes 3, 4, 9 et 10). De plus, 8 semaines après le traitement au Tamoxifène, seul  
 20 l'allèle RXR $\alpha$ <sup>L-</sup> a été détecté dans l'épiderme de souris K14-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> indiquant que RXR $\alpha$  a été excisé dans la plupart sinon toutes les cellules souches de l'épiderme. L'inactivation de RXR $\alpha$  apparaît également dans les autres épithélia d'autres organes  
 25 dans lesquels le promoteur K14 est actif (Wang et al., 1997) (c'est-à-dire la langue, l'œsophage, l'estomac).

A partir de 6 semaines après le début du traitement au Tamoxifène, les souris K14-Cre-



ER<sup>T2(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> présentent des anomalies similaires à celles observées dans les souris K5-Cre-ER<sup>T(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> traitées au Tamoxifène, c'est-à-dire une perte de poil marquée avec des kystes visibles, tandis que des lésions focales visibles apparaissent à des étapes ultérieures (figure 2K et L).

Les anomalies histologiques dermique et épidermique sous-jacentes sont également similaires à celles observées ci-dessus pour les souris K5-Cre-ER<sup>T(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> traitées au Tamoxifène.

L'inactivation du RXR $\alpha$  floxé dans l'épiderme adulte est obtenue plus rapidement et avec des doses de Tamoxifène inférieures avec les souris K14-Cre-ER<sup>T2</sup> qu'avec les souris K5-Cre-ER<sup>T</sup>, mais les anomalies résultantes de la peau sont finalement similaires, dans les deux cas, plus sévères chez les femelles que chez les mâles.

De manière intéressante, ces anomalies sont également similaires à celles observées dans les souris K14-Cre<sup>(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/L2</sup> ou K14-Cre<sup>(tg/0)</sup>/RXR $\alpha$ <sup>L2/-</sup> dans lesquelles les allèles RXR floxés sont sélectivement excisés dans l'épiderme durant le développement fœtal, conduisant ainsi à une inactivation de RXR $\alpha$  dans les kératinocytes de l'épiderme et dans les gaines des racines des follicules pileux. En fait, à partir de l'âge de trois semaines, ces mutants RXR $\alpha$  "constitutifs" et spécifiques de l'épiderme développent une alopecie progressive avec des caractéristiques typiques de follicules pileux dégénérés, des utricules

et des kystes dermiques, qui peuvent tous être attribués à des défauts dans le cycle du poil. De plus, ces mutants présentent également une hyperprolifération interfolliculaire des kératinocytes, ainsi qu'une  
 5 différenciation terminale anormale (avec une expression de K6), et une augmentation de la cellularité dermique associée avec une réaction inflammatoire de la peau.

Bien que  $RXR\beta$  soit exprimée dans l'épiderme de la souris, la peau des mutants adultes  $RXR\beta^{-/-}$  apparaît  
 10 normale (Kastner et al., 1996), suggérant ainsi des redondances fonctionnelles entre les différents RXR. Comme attendu, des souris  $K5-Cre-ER^{T(tg/0)}/RXR\alpha^{L2/-}/RXR\beta^{-/-}$  et  $K5-Cre-ER^{T(tg/0)}/RXR\alpha^{L2/L2}/RXR\beta^{-/-}$  traitées avec de l'huile (sans Tamoxifène) ne présentent pas d'anomalies  
 15 de la peau, alors qu'après un traitement au Tamoxifène, ces souris commencent à perdre leurs poils 4 semaines après le premier traitement au Tamoxifène tandis que de larges régions de la peau sont sans poil seize à dix-huit semaines après le début du traitement (comparer la  
 20 figure 3A avec la figure 2D).

Des lésions focales de la peau qui n'étaient pas observées chez les mutants simples  $RXR\alpha$ , sont également observées fréquemment chez les doubles mutants  $RXR\alpha/\beta$  quatorze à seize semaines après le premier traitement  
 25 au Tamoxifène. En particulier sur la peau sans poil du tronc, derrière les oreilles, et autour de la bouche (figure 3A).

L'histologie de la peau sans poil montre une disparition des follicules pileux et la présence  
 30 d'utriculi et de kystes dermiques (figure 3B).

L'épiderme est hautement hyperplastique et hyperkératinisé (comparer les figures 3B et 3C avec les figures 2E et 2G, et figures 2F et 2H). Une expression anormale de K6 est observée à travers tout l'épiderme (figure 3D) et une réaction inflammatoire avec une augmentation de la cellularité est également observée (figure 3B). Dans la peau lésée, l'épiderme est couvert d'une croûte et davantage hyperplastique et hyperkératinisé. Les triples mutants K5-Cre-  
 5  $ER^{T(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/L2}/RXR_{\beta}^{-/-}/RXR_{\gamma}^{-/-}$  ne révèlent pas de rôle additionnel de  $RXR_{\gamma}$  dans la peau adulte. Ainsi,  $RXR_{\beta}$  peut partiellement compenser pour la perte de fonction de  $RXR_{\alpha}$ .  
 10

De manière intéressante, la redondance fonctionnelle est plus prononcée chez les mâles que chez les femelles, puisque les doubles mutants  $RXR_{\alpha}/RXR_{\beta}$  mâles et femelles sont affectés de manière similaire à la différence des mutants simples.  
 15

Pris dans leur ensemble, les résultats précédents montrent l'efficacité des recombinaisons Cre- $ER^T$ , Cre- $ER^{T2}$  et Cre- $ER^{T3}$  (voir exemple 5 et figures 9, 10 et 11) pour générer des mutations somatiques ciblées, spécifiques d'un type cellulaire et contrôlées temporellement, dans des tissus de souris adultes.  
 20

Les résultats précédents permettent également de démontrer l'utilisation de souris Cre- $ER^T$ - $RXR$ floxé pour analyser et étudier la fonction biologique complexe des différents sous-types de  $RXR$  ( $RXR_{\alpha}$ ,  $RXR_{\beta}$ ,  $RXR_{\gamma}$ ) dans un tissu particulier, c'est-à-dire l'épiderme.  
 25

Cette étude a ainsi permis de révéler l'existence de redondances fonctionnelles entre RXR $\alpha$  et RXR $\beta$ , bien que le rôle de RXR $\alpha$  soit clairement prépondérant.

Le mécanisme d'action des différents RXR dans les événements moléculaires qui conduisent à l'alopécie et aux anomalies des kératinocytes de l'épiderme déficients en récepteurs nucléaires RXR, demeure inconnu.

Néanmoins, leur rôle comme partenaires hétérodimériques d'un certain nombre de récepteurs nucléaires (par exemple RAR $\gamma$ , TR $\gamma$ , VDR, PPAR) agissant comme des transducteurs du signal dans différentes voies de signalisation a été suggéré dans de nombreuses études *in vitro* utilisant des cellules en culture, et confirmé *in vivo* dans quelques cas en utilisant la mutagenèse ciblée (Chambon, 1996 ; Mascrez et al., 1998 ; Wendling et al., 1999). De manière intéressante, comme RXR $\alpha$ , VDR est exprimé dans les ORS du follicule pileux (Reichrath et al., 1994), et des souris dont les deux allèles du gène VDR sont inactifs (souris « knock-out » VDR) développent une alopécie secondaire progressive, suggérant que VDR est impliqué dans le cycle du poil plutôt que dans la pousse primaire du poil (Yoshizawa et al., 1997 ; Li et al., 1997 ; Li et al., 1998).

De manière intéressante, les alopécies développées par les souris VDR $^{-/-}$  de quatorze semaines et les souris K5-Cre-ER $^{T(tg/0)}$ /RXR $\alpha^{L2/L2}$ /RXR $\beta^{-/-}$  dix-huit semaines après leur traitement au Tamoxifène apparaissent très similaires, bien que la peau des souris VDR $^{-/-}$  ne

présente pas les lésions observées sur l'épiderme des souris déficientes en RXR (comparer les figures 3A et 3E).

Au niveau histologique, des utricules et des kystes dermiques similaires sont observés (comparer les figures 3B et 3F), mais aucune hyperprolifération des kératinocytes, ni de différenciation anormale révélée par l'expression de K6, n'est observée dans l'épiderme des souris  $VDR^{-/-}$  (comparer figures 3C et 3D avec la figure 3G et 3H). Ainsi, l'alopécie générée par l'inactivation sélective de RXR dans les kératinocytes de la souris adulte révélerait un rôle majeur des hétérodimères RXR/VDR dans le cycle du follicule pileux.

15

### 3) Deuxième exemple : Inactivation ciblée du gène SNF2 $\beta$ dans l'épiderme de souris adulte.

Pour inactiver le gène SNF2 $\beta$  dans l'épiderme de souris adulte, les inventeurs ont construit une souris portant des allèles SNF2 $\beta$  floxés (L2+ ; figure 4A) et ont utilisé la lignée de souris transgéniques K14-Cre-ER<sup>T2</sup> dans lesquelles le Tamoxifène induit efficacement la recombinaison médiée par la Cre dans les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. Des souris K14-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/SNF2 $\beta^{L2/L2}$  et K14-Cre-ER<sup>T2(0/0)</sup>/SNF2 $\beta^{L2/L2}$  de huit semaines ont été traitées au Tamoxifène pendant cinq jours à raison de 0,1 mg/jour ou avec de l'huile (-). Des biopsies de peau ont été prélevées, le derme et l'épiderme séparés, l'ADN

génomique préparé, digéré par BamHI, séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, et transféré sur des membranes de nylon qui furent hybridées avec la sonde 5' (figure 4A) radiomarquée. Les auto-radiographies correspondantes sont présentées figure 4B. En l'absence de Tamoxifène, aucune excision dans le gène SNF2 $\beta$  n'est observée que ce soit dans le derme ou l'épiderme de souris K14-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/SNF2 $\beta$ <sup>L2/L2</sup>. En revanche, l'injection de Tamoxifène chez ces mêmes souris induit l'excision du fragment floxé du gène SNF2 $\beta$  uniquement dans l'épiderme, car le promoteur K14 n'est actif que dans ce tissu et non pas dans le derme. Comme attendu, le Tamoxifène n'induit aucune excision dans des souris "contrôles" K14-Cre-ER<sup>T2(0/0)</sup>/SNF2 $\beta$ <sup>L2/L2</sup> dont les cellules ne contiennent pas de transgène Cre-ER<sup>T2</sup>.

#### 4) Troisième exemple : Inactivation ciblée du gène RXR $\alpha$ dans les adipocytes murins.

Pour réaliser la mutagenèse site-spécifique contrôlée de manière spatio-temporelle dans les adipocytes, les inventeurs ont créé des souris transgéniques appelées aP2-Cre-ER<sup>T2</sup> exprimant la protéine de fusion Cre-ER<sup>T2</sup> sous le contrôle du promoteur du gène codant pour la protéine adipose 2 (aP2) qui est actif spécifiquement dans les adipocytes. (Ross et al., 1990).

Pour invalider le gène RXR $\alpha$  sélectivement dans les adipocytes, les souris aP2-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup> ont d'abord été croisées avec des souris RXR $\alpha$ <sup>L2/+</sup> pour produire des

souris  $aP2-Cre-ER^{T2(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/L2}$ . Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris  $RXR_{\alpha}^{+/-}$  (Kastner et al., 1994) pour produire des souris  $aP2-Cre-ER^{T2(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/-}$ . De telles souris, âgées de quatre  
 5 semaines, ont été traitées (+) ou non (-) au Tamoxifène (1 mg/jour) pendant cinq jours, et le tissu adipeux prélevé un mois après la dernière injection de Tamoxifène. L'ADN a été extrait du tissu adipeux, ou après séparation des adipocytes (adipocytes purifiés à  
 10 80%) du tissu conjonctif et vaisseaux sanguins (non adipocytes). L'ADN est ensuite digéré par BamHI, puis séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, transféré sur des membranes de nylon, puis hybridé avec la sonde X4 radiomarquée. Les radiographies correspondantes sont  
 15 présentées figure 5.

En absence de Tamoxifène, aucune excision dans le gène  $RXR_{\alpha}$  n'est observée que ce soit dans le tissu adipeux, les adipocytes, ou d'autres cellules non adipocytaires de l'épiderme de souris  $aP2-Cre-ER^{T2(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/-}$ . En revanche, l'injection de  
 20 Tamoxifène chez ces mêmes souris induit l'excision du fragment floxé du gène  $RXR_{\alpha}$  uniquement dans les adipocytes purifiés et le tissu adipeux.

L'analyse du poids des animaux  $aP2-Cre-ER^{T2(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/-}$  et  $aP2-Cre-ER^{T2(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/+}$  traités au  
 25 Tam (mutants; KO, et contrôles; CT, respectivement) et nourris avec une alimentation normale (AN), déterminé pendant 30 semaines, n'a révélé aucune différence significative entre les deux groupes d'animaux (Figure  
 30 6A). De plus, le poids du tissu adipeux, ainsi que la

morphologie des adipocytes étaient similaires (Figure 6B et 6C). Par contre, le taux de glucose était anormalement élevé et les niveaux de triglycérides étaient plus faibles chez les animaux mutants (Figure 6D). En nourrissant les animaux contrôles traités au tamoxifène avec une alimentation riche en graisse et en glucose (AR) ceux-ci deviennent obèses (augmentation du poids, de la masse de tissu adipeux et hypertrophie des adipocytes) (Figures 6A-C). les niveaux de triglycérides et d'insuline sont également beaucoup plus élevés que chez les animaux nourris avec de l'AN. Par contre, aucune augmentation de poids des animaux et de masse de tissu adipeux n'est observée chez les animaux mutés nourris avec AR. De plus les adipocytes ne sont pas hypertrophiques, et les niveaux de triglycérides et d'insuline sont similaires à ceux observés avec une AN.

Ces animaux mutants constituent donc des modèles intéressants pour étudier l'obésité et le diabète, ainsi que pour tester des traitements de ces maladies.

#### 5) Quatrième exemple : Inactivation ciblée du gène RXR $\alpha$ dans les hépatocytes murins.

Pour réaliser la mutagenèse site-spécifique contrôlée de manière spatio-temporelle dans le foie, les inventeurs ont créé des souris transgéniques appelées «  $\alpha$ AT-Cre-ER<sup>T</sup> » exprimant la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> sous le contrôle du promoteur du gène de l' $\alpha$ -1-antitrypsine humaine qui est actif spécifiquement dans les hépatocytes (Imai et al., 2000).



Pour inactiver  $RXR_{\alpha}$  dans les hépatocytes murins, les inventeurs ont construit une souris portant des allèles  $RXR_{\alpha}^{L2}$  floxés (figure 1A) et ont utilisé la lignée de souris transgéniques  $\alpha AT-Cre-ER^T$  dans lesquelles le Tamoxifène (Tam) induit efficacement la recombinaison médiée par la Cre dans les hépatocytes (figure 7). Des souris  $\alpha AT-Cre-ER^{T(tg/0)}$  qui expriment  $Cre-ER^T$  dans environ 50% des hépatocytes (Imaï et al. 2000) ont été croisées avec des souris  $RXR_{\alpha}^{L2/L2}$  pour produire des souris  $\alpha AT-Cre-ER^{T(tg/0)}/RXR_{\alpha}^{L2/L2}$ . De telles souris, âgées de trois mois, ont été traitées au Tam (1 mg/jour) pendant cinq jours, et le cœur et le foie prélevés sept jours après la première injection de Tam (jour 7), sur respectivement un et trois animaux. Le cœur et le foie ont également été prélevés sur respectivement un et trois animaux du même génotype sans traitement au Tam (Jour 0). L'ADN a été extrait de ces tissus, et après digestion par BamHI, les allèles de  $RXR_{\alpha}$  ont été analysés par Southern blot.

Comme attendu, aucune excision n'est observée dans les cellules du cœur des souris traitées au Tamoxifène (figure 7) ou le foie de souris non traitées au Tamoxifène (Jour 0). En revanche, au jour 7, les souris traitées au Tamoxifène présentent une excision dans le gène  $RXR_{\alpha}$  dans environ 50% des cellules de foie, ce qui correspond bien à l'expression en mosaïque de la protéine  $Cre-ER^T$  dans les hépatocytes de la souris  $\alpha AT-Cre-ER^T$ .

Par contre, 30 et 90 jours après le traitement au tamoxifène pratiquement plus de cellules  $RXR_{\alpha}$  nulles ne sont observées (Fig.8). De plus, les cellules  $RXR_{\alpha}^{L-/L-}$  se multiplient beaucoup moins que les cellules  $RXR_{\alpha}^{L2/L2}$  après hépatectomie partielle (HP) réalisée sur des animaux mutants traités au tamoxifène (Fig 8, comparer les pistes 6-8 et les pistes 15-17). Ainsi,  $RXR_{\alpha}$  est impliqué dans la prolifération des hépatocytes.

10 6) Cinquième exemple : La recombinaise Cre chimérique  $Cre-ER^{T3}$  est dix fois plus sensible au Tamoxifène que  $Cre-ER^{T2}$ .

Dans le but d'augmenter la sensibilité de la recombinaise chimérique  $Cre-ER^{T2}$  au Tam ou OHT, les inventeurs ont remplacé dans  $Cre-ER^{T2}$  la V400 par G (mutant  $Cre-ER$  M543A/L544A, appelé «  $Cre-ER^{T3}$  »). Des souris transgéniques exprimant  $Cre-ER^{T3}$  sous le contrôle du promoteur K5 ont été obtenues, et une lignée exprimant la recombinaise chimérique à des niveaux similaires à ceux détectés dans les lignées K5- $Cre-ER^T$  et K5- $Cre-ER^{T2}$  a été générée (voir figure 9, et résultats non présentés).

La sensibilité à l'OHT a été testée dans un premier temps en analysant la localisation intracellulaire des protéines chimériques. Alors qu'après un traitement par 0,1 mg d'OHT,  $Cre-ER^{T2}$  et  $Cre-ER^{T3}$  sont tous les deux localisés dans les noyaux cellulaires,  $Cre-ER^{T3}$  est présent dans une plus grande

fraction de ceux-ci à des doses plus faibles de Tam ou d'OHT. A la dose de 0,001 mg, environ 1/3 des noyaux sont fortement marqués par des anticorps anti-Cre dans la couche basale de l'épiderme des souris K5-Cre-ER<sup>T3</sup>,  
5 alors qu'aucun noyau positif n'est observé dans la peau de souris K5-Cre-ER<sup>T2</sup> (figure 10). Cette différence de sensibilité a également pu être visualisée en utilisant les souris reportrices Rosa26R (Rosa<sup>fl/+</sup>) (Soriano, 1999). En effet, bien que les niveaux d'excisions  
10 induits par 1 et 0,1 mg de OHT soient similaires dans les deux lignées, l'excision est nettement plus efficace dans les souris K5-Cre-ER<sup>T3</sup> suite à des traitements par 0,01 et 0,001 mg de OHT, (figure 11). Notez qu'en l'absence de traitement, aucune activité  
15 recombinaise n'est détectée dans la lignée K5-Cre-ER<sup>T3</sup>.

REFERENCES

- Akagi et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25 : 1766-1773.
- Araki et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :160-  
5 164.
- Arnheiter et al. (1990) Cell 62 : 51.
- Babinet (1995) Médecine/Sciences 11 : 1154-1157.
- Barbonis et al. (1993) Nucleic Acids Research, 21 :  
2025-2029.
- 10 Baretino et al. (1994) EMBO J. 13 : 3039-3049.
- Baur et al. (1996) EMBO J. 15 : 110-124.
- Beato (1989) Cell 56 : 335-344.
- Betz et al. (1996) Curr. Biol. 6 :1307-1316.
- Bourguet et al. (1995) Nature 375 : 377-382.
- 15 Brinster et al. (1982) Nature 296 : 39-42.
- Brocard et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 :  
14559-14563.
- Brocard et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26 : 4086-  
4090.
- 20 Brown et al. (1987) Cell 49 : 603-612.
- Cadepond et al. (1997) Ann. Rev. Med. 48 : 129-156.
- Capecchi (1989) Science 244 :1288-1291.
- Cavaillès et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :  
10009-10013.
- 25 Cavaillès et al. (1995) EMBO J. 14 : 3741-3751.
- Chambon (1996) FASEB J. 10 : 940-954.
- Danielian et al. (1992) EMBO J. 11 : 1025-1033.
- Denisen et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 :  
7376-7380.
- 30 Diaz et al., (199) JBC 274 : 6634.
- Deuschle et al. (1990) Science 2 : 480-483.

- Durand *et al.* (1995) *EMBO J.* 13 : 5370-5382.
- Evans (1988) *Science* 240:889-895.
- Feil *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93 :10887-10890.
- 5 Feil *et al.* (1997) *Biochemical and Biophysical Res. Com.* 237 : 752-757.
- Figge *et al.* (1988) *Cell* 52 : 713-722.
- Gossen *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 5547-5551.
- 10 Green and Chambon (1988) *Trends Genetics* 4 : 309-314.
- Gronemeyer (1991) *Ann. Rev. Genet.* 25 : 89-123.
- Gu *et al.* (1993) *Cell* 73 : 1155-1164.
- Halachmi *et al.* (1994) *Science* 264 : 1455-1458.
- Hu *et al.* (1987) *Cell* 48 : 555-556.
- 15 Hug *et al.* (1998) *Mol. Cell. Biol.* 8 : 3065.
- Hynes *et al.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 2038-2042.
- Imai *et al.* (2000) *Genesis* 26 : 147-148.
- Indra *et al.* (1999) *Nucl. Acid. Res.* 27 : 4324-4327.
- 20 Israel *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17 : 2589-2604).
- Jaenisch (1988) *Science* 240 :1468-1474.
- Kastner *et al.* (1994) *Cell* 78 : 987-1003.
- Kastner *et al.* (1996) *Gene Dev.* 10 : 80-92. 67.
- 25 Kellendonk *et al.* (1996) *Nucleic Acids. Res.* 24 :1404-1411.
- Kellendonk *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 285 : 175-182.
- Kilby *et al.* (1993) *TIG* 9 : 413-421.
- Jackson *et al.*, (1993) *EMBO* 12 : 2809-2819.
- 30 Klock *et al.* (1987) *Nature* 329 : 734-736.
- Kühn *et al.* (1995) *Science* 269 :1427-1429.

- Labow et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10 : 3343-3356.
- Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89 : 6232-6236.
- Ledouarin B. et al. (1995) EMBO J. 14 : 2020-2033.
- 5 Lee et al. (1981) Nature 294 : 228-232.
- Lee et al. (1995) Nature 374 : 91-94.
- Leng et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15 : 255-263.
- Li et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 9831-9835.
- 10 Li et al. (1998) Endocrinology 139 : 4391-4396).
- Littlewood et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23 : 1686-1690.
- Lobe et al. (1999) Dev. Biol. 208 : 281-292.
- Logie et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- 15 92 : 5940-5944.
- Mahfoudi et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 4206-4210.
- Mao et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 5037-5042.
- 20 Mascrez et al. (1998) Developement 125 : 4691-4707.
- Mayo et al. (1982) Cell 29 : 99-108.
- Metzger et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 6991-6995.
- Metzger et Chambon (2000), Methods, *in press*.
- 25 Metzger et Feil (1999), Curr. Opin. Biotechnol. 5 : 470-476.
- Nover et al. (1991) in « Heat Shock Response », e.d. Nover, L CRC, Boca Raton, Fl pp. 167-220.
- Orban et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89 : 6861-
- 30 6865.
- Parker (1993) Curr. Opin. Cell. Biol. 5 : 499-504.

- Peters et al. (1997) J. Biol. Chem 272 : 27307-27312.
- Picard et al. (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5 : 511-515.
- Porter et al. (1998) J. Invent. Dermatol. 110 : 951-957.
- Rajewsky et al. (1996) J. Clin. Invest. 98 : 600-603.
- Reichrath et al. (1994) Brit. J. Dermatol. 131 : 477-482.
- Renaud et al. (1995) Nature 378 : 681-689.
- 10 Ross et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci USA 87 : 9590-9594.
- Saatcioglu et al. (1993) Mol. Cell. Biol. 13 : 3675-3685.
- St-Onge et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24 : 3875-3877.
- 15 Sambrook et al. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual second edition - Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. USA
- Saitou et al. (1995) Nature 374 : 159-162.
- Sauer (1994) Current opinion in Biotechnology 5 : 521-527.
- 20 Sauer et al. (1990) The New Biologist 2 : 441-449.
- Sauer B. (1998) Methods 14 : 381-392.
- Schmedt et al. (1998) Nature 394 : 901-904.
- Schmidt et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10 : 4406-4411.
- 25 Schwenk et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26 : 1427-1432.
- Seark et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5 : 1480-1489.
- Shaikh et Sadowski (2000) J. Mol. Biol. 302 : 27-48.
- Simons (1994) New York. Vitam. Horm. 49 : 49-130.
- 30 Soriano (1999) Nature Genet 21 : 70-71.
- Sternberg et al. (1986) J. Mol. Biol. 187 : 197-212.

- Sumi-Chinose et al. (1997) Mol. Cell. Biology 17, 5976-5986.
- Sundberg et al. (1996) Dermatol. 7 : 249-267.
- Vassar et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 :  
5 1563-1567.
- Wang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 219-226.
- Wendling et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 547-551.
- 10 Wurtz et al. (1996) Natural Structural Biology 3 : 87-93.
- Yoshizawa et al. (1997) Nature Genet. 16 : 391-396.
- Zechel et al. (1994) EMBO J. 13 : 1425-1433.
- Zhang et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24 : 543-548.  
15



REVENDICATIONS

1. Organisme métazoaire, à l'exception de l'homme, caractérisé en ce qu'au moins une cellule dudit organisme comprend au moins :
- (i) une protéine de fusion comprenant séquentiellement :
- une protéine recombinase ;
  - une région charnière d'au moins 15 acides aminés ;
  - un polypeptide comprenant le domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire des œstrogènes humains, ou du récepteur nucléaire des œstrogènes des vertébrés, et leurs variants naturels ou l'un de leurs fragments, ledit polypeptide présentant au moins une mutation par rapport à la forme sauvage desdits domaines de liaison du ligand, ou de leurs variants naturels, ou de leurs fragments,
- ladite protéine de fusion ayant une activité recombinase négligeable, voire nulle, en présence de ligand naturel, et une activité recombinase induite par de faibles quantités de ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique ;
- (ii) une ou des séquence(s) d'ADN génique ou intergénique d'intérêt appartenant naturellement au génome dudit organisme dans laquelle (lesquelles) est(sont) inséré(s) un ou plusieurs site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinase, la ou lesdites séquence(s) d'ADN d'intérêt étant localisée(s) dans l'un ou

plusieurs des chromosomes du génome de ladite cellule.

2. Organisme selon la revendication 1, caractérisé  
5 en ce que ladite protéine recombinase est sélectionnée de préférence dans le groupe des recombinases sites spécifiques composé de la recombinase Cre du bactériophage P1, la recombinase FLP de *Saccharomyces cerevisiae*, la recombinase R de pSR1 de  
10 *Zygosaccharomyces rouxii*, la recombinase A de pKD1 de *Kluyveromyces drosophilarium*, la recombinase A de pKW1 de *Kluyveromyces waltii*, l'intégrase  $\lambda$  Int, la recombinase du système de recombinaison GIN du phage Mu, de la recombinase bactérienne  $\beta$ , ou une variante de  
15 celles-ci.

3. Organisme selon la revendication 2, caractérisé en ce que la recombinase est la recombinase Cre du bactériophage P1 et ses variants naturels ou  
20 synthétiques.

4. Organisme selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdits sites de reconnaissance spécifiques de ladite recombinase Cre sont choisis de  
25 préférence dans le groupe composé des séquences Lox P, Lox 66, Lox 71, Lox 511, Lox 512, Lox 514.

5. Organisme selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite région charnière comprend  
30 tout ou partie de la région charnière D d'un récepteur nucléaire des œstrogènes, région située entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison du

ligand, soit un peptide fonctionnellement équivalent à ladite région charnière D.

6. Organisme selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite région charnière comprend les acides aminés 282 à 301 de la séquence SEQ ID N° 2.

7. Organisme selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit polypeptide choisi parmi le domaine de liaison du ligand des récepteurs nucléaires des œstrogènes humains ou ses variants naturels, ou l'un de leurs fragments est le domaine de liaison du ligand du récepteur nucléaire des œstrogènes humain  $\alpha$  ou ses variants naturels, ou l'un de leurs fragments et que ledit domaine de liaison du ligand ou l'un de ses variants naturels, ou l'un de leurs fragments présente au moins une mutation choisie dans le groupe :

- mutation (G521R) glycine vers arginine en position 521 de la séquence SEQ ID N° 2 ou d'un variant naturel de cette séquence;
- mutation (G400V) glycine vers valine en position 400 de la séquence SEQ ID N° 2 ou d'un variant naturel de cette séquence;
- mutation (méthionine-leucine) vers (alanine-alanine) situé en position 543-544 (mutation M543A/L544A) de la séquence SEQ ID N° 2 ou d'un variant naturel de cette séquence.

8. Organisme selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite protéine de fusion est codée par un gène de

fusion intégré dans un ou plusieurs des chromosomes de ladite cellule dudit organisme, ledit gène de fusion étant sous le contrôle d'éléments d'expression assurant son expression dans au moins une cellule dudit organisme.

9. Organisme selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ladite protéine de fusion est codée par un gène de fusion intégré dans un vecteur d'expression extra-chromosomique, ledit gène de fusion étant sous le contrôle d'éléments d'expression assurant son expression dans au moins une cellule dudit organisme.

10. Organisme selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisé en ce que lesdits éléments d'expression sont choisis parmi les éléments contrôlant l'expression tissus-spécifiques ou cellules-spécifiques et les éléments d'expression ubiquitaires.

11. Organisme selon les revendications 8 à 10, caractérisé en ce que lesdits éléments contrôlant l'expression sont choisis parmi les éléments contrôlant l'expression assurant une expression constitutive et les éléments contrôlant l'expression assurant une expression inductible.

12. Organisme selon les revendications 8 à 11, caractérisé en ce que ledit élément d'expression est choisi dans le groupe composé des promoteurs de la cytokératine 14 (K 14), de la cytokératine 5 (K 5), de la protéine adipeuse 2 (aP2) et de l' $\alpha$ -1-antitrypsine.

13. Organisme selon l'une des revendications 8 à 12, caractérisé en ce que ledit gène de fusion de séquence SEQ ID N° 3 code pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> de séquence SEQ ID N° 4.

5

14. Organisme selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, caractérisé en ce que ledit gène de fusion de séquence SEQ ID N° 5 code pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T2</sup> de séquence SEQ ID N° 6.

10

15. Organisme selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, caractérisé en ce que ledit gène de fusion de séquence SEQ ID N° 7 code pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T3</sup> de séquence SEQ ID N° 8.

15

16. Organisme selon les revendications 9 à 15, caractérisé en ce que ledit gène de fusion comprend de préférence dans le sens 5' → 3' :

- un fragment d'ADN codant pour la recombinaise Cre du bactériophage P1 ou l'un de ses variants ;
- un fragment d'ADN d'au moins 45 nucléotides codant au moins soit pour tout ou partie de la région charnière D d'un récepteur nucléaire des œstrogènes, soit pour un peptide fonctionnellement équivalent à ladite région charnière D ; et
- un fragment d'ADN codant pour le domaine de liaison du ligand (LBD) d'un récepteur nucléaire des œstrogènes, ou de leurs variants, ledit fragment d'ADN présentant au moins une mutation conférant au LBD la capacité de répondre aux anti-œstrogènes synthétiques mais non pas aux agonistes œstrogéniques naturels.

30

17. Organisme selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ladite protéine de fusion est introduite dans au moins une cellule dudit organisme.

5

18. Organisme selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que ledit ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique induisant l'activité de la recombinaise est choisi dans  
10 le groupe composé du Tamoxifène, du 4-hydroxyTamoxifène, de l'ICI 164 384 et de l'ICI 182 780.

19. Organisme selon l'une quelconque des  
15 revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN d'intérêt est un gène sélectionné dans le groupe composé de  $RXR_{\alpha}$ ,  $RXR_{\beta}$ ,  $RXR_{\gamma}$ ,  $RAR_{\alpha}$ ,  $RAR_{\beta}$ ,  $RAR_{\gamma}$ ,  $SNF2_{\beta}$ .

20. Organisme selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit organisme est un animal, notamment une souris.

21. Organisme selon la revendication 20,  
25 caractérisé en ce qu'au moins une des cellules de ladite souris comprend :

- un gène de fusion codant pour la protéine de fusion  $Cre-ER^T$  de séquence SEQ ID N° 4, ou  $Cre-ER^{T2}$  de séquence ID N° 6, ou  $Cre-ER^{T3}$  de séquence ID N° 8,  
30 ledit gène de fusion étant sous le contrôle du promoteur de la cytokératine K5 ;

- une ou des séquences d'ADN chromosomique d'intérêt dans leur contexte chromatinien naturel et encadrée(s) de site lox (« floxées »).

5        22. Organisme selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'au moins une des cellules de ladite souris comprend :

- un gène de fusion codant pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> de séquence SEQ ID N° 4, ou Cre-ER<sup>T2</sup> de  
10 séquence ID N° 6, ou Cre-ER<sup>T3</sup> de séquence ID N° 8, ledit gène de fusion étant sous le contrôle du promoteur de la cytokératine K14 ;
- une ou des séquences d'ADN chromosomique d'intérêt dans leur contexte chromatinien naturel et  
15 encadrée(s) de site lox (« floxées »).

23. Organisme selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'au moins une des cellules de ladite souris comprend :

- 20 - un gène de fusion codant pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> de séquence SEQ ID N° 4, ou Cre-ER<sup>T2</sup> de séquence ID N° 6, ou Cre-ER<sup>T3</sup> de séquence ID N° 8, ledit gène de fusion étant sous le contrôle du promoteur de la protéine adipose 2 (aP2) ;
- 25 - une ou des séquences d'ADN chromosomique d'intérêt dans leur contexte chromatinien naturel et encadrée(s) de site lox (« floxées »).

24. Organisme selon la revendication 20,  
30 caractérisé en ce qu'au moins une des cellules de ladite souris comprend :

- un gène de fusion codant pour la protéine de fusion Cre-ER<sup>T</sup> de séquence SEQ ID N° 4, ou Cre-ER<sup>T2</sup> de séquence ID N° 6, ou Cre-ER<sup>T3</sup> de séquence ID N° 8, ledit gène de fusion étant sous le contrôle du promoteur de l' $\alpha$ -1-antitrypsine.
- une ou des séquences d'ADN chromosomique d'intérêt dans leur contexte chromatinien naturel et encadrée(s) de site lox (« floxées »).

25. Procédé de préparation d'un organisme métazoaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) obtention d'une cellule souche embryonnaire (ES) modifiée par insertion de site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinase dans ladite (lesdites) séquence(s) d'ADN d'intérêt, localisées dans un ou plusieurs chromosomes, par recombinaison homologue ;
- b) introduction de ladite cellule souche embryonnaire modifiée dans un embryon dudit organisme ;
- c) développement dudit embryon jusqu'au stade d'un organisme adulte fertile ;
- d) croisement dudit organisme adulte fertile avec un organisme transgénique dont au moins une des cellules exprime ladite protéine de fusion et obtention des descendants issus dudit croisement ; et
- e) facultativement, sélection, parmi lesdits descendants, dudit organisme métazoaire.



26. Procédé de préparation d'un organisme métazoaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) Obtention d'une cellule somatique modifiée par insertion de site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinase dans ladite (lesdites) séquence(s) d'ADN d'intérêt localisée(s) dans un ou plusieurs chromosome(s), par recombinaison  
10 homologue ;
- b) transfert du noyau de ladite cellule somatique modifiée dans le cytoplasme d'un oocyte receveur énucléé ;
- c) développement de l'embryon obtenu à l'étape b)  
15 jusqu'au stade d'un organisme adulte fertile ;
- d) croisement dudit organisme adulte fertile avec un organisme transgénique dont au moins une des cellules exprime ladite protéine de fusion et obtention des descendants issus dudit croisement ;  
20 et
- e) facultativement, sélection, parmi les descendants dudit organisme métazoaire.

27. Procédé de préparation d'un organisme  
25 métazoaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) obtention d'une cellule souche embryonnaire (ES)  
30 modifiée par insertion de site(s) de reconnaissance de ladite protéine recombinase dans ladite (lesdites) séquence(s) d'ADN d'intérêt,

localisée(s) dans un ou plusieurs chromosome(s),  
par recombinaison homologue ;

- b) introduction de ladite cellule souche embryonnaire  
modifiée dans un embryon dudit organisme ;
- 5 c) développement dudit embryon ; et
- d) introduction de ladite protéine de fusion dans au  
moins une cellule dudit embryon ou de l'organisme  
issu du développement dudit embryon.

10 28. Procédé de préparation d'un organisme  
métazoaire selon l'une quelconque des revendications 1  
à 24, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes  
suivantes :

- a) Obtention d'une cellule somatique modifiée par  
15 insertion de site(s) de reconnaissance de ladite  
protéine recombinase dans ladite (lesdites)  
séquence(s) d'ADN d'intérêt localisée(s) dans un  
ou plusieurs chromosome(s), par recombinaison  
homologue ;
- 20 b) transfert du noyau de ladite cellule somatique  
modifiée dans le cytoplasme d'un oocyte receveur  
énucléé ;
- c) développement dudit embryon ; et
- d) introduction de ladite protéine de fusion dans au  
25 moins une cellule dudit embryon ou dudit organisme  
issu du développement dudit embryon.

29. Procédé de recombinaison, notamment  
d'excision, d'insertion, d'inversion, de translocation,  
30 conditionnelle au niveau de la séquence d'ADN d'intérêt  
dans laquelle est(sont) inséré(s) un ou plusieurs sites  
de reconnaissance de ladite protéine recombinase,

ladite séquence d'ADN d'intérêt étant localisée dans un ou plusieurs des chromosomes dudit génome de ladite cellule dudit organisme selon les revendications 1 à 24, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes de :

- 5 (i) mise en présence d'au moins une cellule dudit organisme avec un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique ;
- (ii) induction de l'activité de la recombinaise de ladite protéine de fusion par ledit ligand  
10 synthétique.

30. Procédé de délétion conditionnelle d'un fragment d'ADN dans lequel on met en œuvre un procédé d'excision selon la revendication 29 et dans lequel  
15 ledit(lesdits) fragment(s) d'ADN à exciser est(sont) encadré(s) par deux sites de reconnaissance de la protéine recombinaise orientés en répétition directe.

31. Procédé d'obtention d'un organisme métazoaire,  
20 à l'exception de l'homme, dont au moins une cellule possède un allèle d'un gène d'intérêt inactivé par un procédé de délétion conditionnelle et dont l'autre allèle dudit gène d'intérêt possède une mutation, de préférence limitée, dans des séquences exoniques et/ou  
25 régulatrices, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il permet d'obtenir chez un organisme métazoaire des mutations somatiques contrôlées dans l'espace et le temps et qui soient limitées (mutations ponctuelles, petites délétions ou insertion) dans des séquences  
30 exoniques et/ou régulatrices, et en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) obtention d'un organisme métazoaire dont au moins une cellule de la lignée germinale comporte ladite mutation dans un des allèles dudit gène d'intérêt ;
- 5 b) croisement dudit organisme obtenu à l'étape a) avec un organisme selon l'une quelconque des revendications 1 à 24 ;
- c) sélection du descendant dont le génome comprend un gène d'intérêt dont un des allèles possède une  
10 mutation et l'autre allèle possède au moins deux sites de reconnaissance de protéines recombinases orientés en répétition directe ;
- d) mise en œuvre du procédé selon les revendications 29 ou 30 de délétion conditionnelle du fragment  
15 d'ADN dudit allèle dudit gène d'intérêt qui est encadré par au moins deux sites de reconnaissance de protéine recombinase orientés en répétition directe ; et
- e) obtention dudit organisme métazoaire dont le  
20 génome d'au moins une cellule comprend ledit gène d'intérêt dont un allèle est inactivé, tandis que l'autre allèle possède une mutation somatique de préférence limitée, et de préférence dans des séquences exoniques et/ou régulatrices.

25

32. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 31, caractérisé en ce que lesdits sites de reconnaissance spécifiques de la protéine recombinase sont les sites Lox P et ladite protéine  
30 recombinase est la protéine Cre du bactériophage P1, ou l'un de ses variants.

33. Organisme susceptible d'être obtenu par la mise en œuvre d'un procédé selon les revendications 25 à 32.

5        34. Organisme selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un animal, notamment d'une souris.

10       35. Procédé d'analyse ou d'étude de la fonction biologique d'une séquence d'ADN d'intérêt, notamment d'un gène, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes de :

- (i) mise en présence d'un organisme selon l'une des revendications 1 à 24, 33 et 34, ou de cellules isolées dudit organisme avec un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique ;
- 15       (ii) facultativement l'induction de l'expression de ladite protéine de fusion ;
- (iii) mise en évidence de l'événement de recombinaison catalysé par l'activité recombinase de ladite protéine de fusion ;
- 20       (iv) étude ou analyse biochimique, physiologique, phénotypique, comportementale, de ladite cellule ou dudit organisme.

25       36. Procédé selon les revendications 29, 30, 31, 32 et 35, caractérisé en ce que la mise en présence desdites cellules dudit organisme avec ledit ligand synthétique se fait selon une voie d'administration choisie parmi la voie orale, la voie topique, 30 l'injection, notamment l'injection intramusculaire, intraveineuse, intracérébrale, intrarachidienne,

intrapéritonéale, ou encore dans le cas d'embryons, de fœtus et de nouveau-nés avant le sevrage par administration dudit ligand synthétique à la mère.

5           37. Procédé de criblage de composés susceptibles d'être utilisés comme médicament pour le traitement préventif et/ou curatif de pathologies associées à une altération de l'expression et/ou de la fonction de ladite séquence d'ADN d'intérêt caractérisé en ce qu'il  
10 comporte l'étape d'administration dudit composé dans un organisme selon les revendications 1 à 24, 33 et 34.

          38. Utilisation d'un organisme selon l'une quelconque des revendications 1 à 24, 33 et 34 ou de  
15 cellules dérivées dudit organisme pour réaliser une recombinaison site-spécifique spatio-temporellement contrôlées de ladite séquence d'ADN d'intérêt dans son environnement chromatinien naturel, avec une efficacité d'au moins 85% en présence de ligand synthétique doté  
20 d'activité anti-œstrogénique dans les cellules dudit organisme exprimant ladite protéine de fusion et avec une efficacité au moins inférieure à 5% en absence dudit ligand synthétique ou en présence de ligand naturel dans les cellules dudit organisme exprimant  
25 ladite protéine de fusion.

          39. Utilisation selon la revendication 38, caractérisée en ce que lesdites cellules dudit organisme sont choisies parmi les cellules de  
30 l'épiderme, les hépatocytes, les adipocytes.

40. Souris transgénique K5-Cre-ER<sup>T</sup> / RXR<sub>α</sub><sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR<sub>α</sub> peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopécie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

10

41. Souris transgénique K5-Cre-ER<sup>T2</sup> / RXR<sub>α</sub><sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR<sub>α</sub> peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopécie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

20

42. Souris transgénique K5-Cre-ER<sup>T3</sup> / RXR<sub>α</sub><sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR<sub>α</sub> peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopécie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

30

43. Souris transgénique K14-Cre-ER<sup>T</sup> / RXR<sub>α</sub><sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR<sub>α</sub> peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un  
5 traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopecie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

10

44. Souris transgénique K14-Cre-ER<sup>T2</sup> / RXR<sub>α</sub><sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR<sub>α</sub> peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un  
15 traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopecie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

20

45. Souris transgénique K14-Cre-ER<sup>T3</sup> / RXR<sub>α</sub><sup>L2/L2</sup> dont le gène RXR<sub>α</sub> peut être sélectivement inactivé dans les kératinocytes de l'épiderme par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un  
25 traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique, entraînant chez ladite souris une alopecie, et/ou une hyperprolifération des kératinocytes et/ou une réaction inflammatoire de la peau.

30



46. Souris transgénique  $\alpha\text{AT-Cre-ER}^T$  /  $\text{RXR}_\alpha^{L2/L2}$  dont  
le gène  $\text{RXR}_\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les  
hépatocytes par la mise en œuvre d'un procédé de  
délétion conditionnelle suite à un traitement par un  
5 ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique  
entraînant chez ladite souris notamment une altération  
de la prolifération des hépatocytes.

47. Souris transgénique  $\alpha\text{AT-Cre-ER}^{T2}$  /  $\text{RXR}_\alpha^{L2/L2}$   
10 dont le gène  $\text{RXR}_\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans  
les hépatocytes par la mise en œuvre d'un procédé de  
délétion conditionnelle suite à un traitement par un  
ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique  
entraînant chez ladite souris notamment une altération  
15 de la prolifération des hépatocytes.

48. Souris transgénique  $\alpha\text{AT-Cre-ER}^{T3}$  /  $\text{RXR}_\alpha^{L2/L2}$   
dont le gène  $\text{RXR}_\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans  
les hépatocytes par la mise en œuvre d'un procédé de  
20 délétion conditionnelle suite à un traitement par un  
ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique  
entraînant chez ladite souris notamment une altération  
de la prolifération des hépatocytes.

25 49. Souris transgénique  $\text{aP2-Cre-ER}^T$  /  $\text{RXR}_\alpha^{L2/L2}$  dont  
le gène  $\text{RXR}_\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les  
adipocytes par la mise en œuvre d'un procédé de  
délétion conditionnelle suite à un traitement par un  
ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique

entraînant chez ladite souris une altération du métabolisme des lipides dans les adipocytes et/ou un diabète.

5            50. Souris transgénique  $\text{aP2-Cre-ER}^{\text{T2}}$  /  $\text{RXR}_\alpha^{\text{L2/L2}}$   
dont le gène  $\text{RXR}_\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les adipocytes par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique  
10 entraînant chez ladite souris une altération du métabolisme des lipides dans les adipocytes et/ou un diabète.

             51. Souris transgénique  $\text{aP2-Cre-ER}^{\text{T3}}$  /  $\text{RXR}_\alpha^{\text{L2/L2}}$   
15 dont le gène  $\text{RXR}_\alpha$  peut être sélectivement inactivé dans les adipocytes par la mise en œuvre d'un procédé de délétion conditionnelle suite à un traitement par un ligand synthétique doté d'activité anti-œstrogénique entraînant chez ladite souris une altération du  
20 métabolisme des lipides dans les adipocytes et/ou un diabète.

             52. Souris transgénique selon l'une des revendications 40 à 51, caractérisée en ce que ledit  
25 gène  $\text{RXR}_\alpha$  est inactivé par la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 30.

             53. Procédé de criblage de composés susceptibles d'être utilisés comme médicament pour le traitement  
30 préventif et/ou curatif de l'alopécie et/ou de

l'hyperprolifération des kératinocytes et/ou des réactions inflammatoires de la peau, caractérisé en ce qu'il comporte l'étape d'administration dudit composé dans une souris selon les revendications 40 à 45 et 52.

5

54. Procédé de criblage de composés susceptibles d'être utilisés comme médicament pour favoriser notamment la régénération hépatique, caractérisé en ce qu'il comporte l'étape d'administration dudit composé dans une souris selon les revendications 46 à 48 et 52.

10

55. Procédé de criblage de composés susceptibles d'être utilisés comme médicament pour le traitement préventif et/ou curatif du diabète et/ou pour le traitement de l'obésité, caractérisé en ce qu'il comporte l'étape d'administration dudit composé dans une souris selon les revendications 49 à 52.

15

20

## LISTE DE SÉQUENCES

<110> ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE EN GENETIQUE MOLECULAIRE  
(ADEREGEM)

<120> Souris transgénique pour la recombinaison ciblée médiée  
par la Cre-ER modifiée

<130> D18961

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1788

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1788)

<400> 1

atg acc atg acc ctc cac acc aaa gca tct ggg atg gcc cta ctg cat	48
Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His	
1 5 10 15	

cag atc caa ggg aac gag ctg gag ccc ctg aac cgt ccg cag ctc aag	96
Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys	
20 25 30	

atc ccc ctg gag cgg ccc ctg ggc gag gtg tac ctg gac agc agc aag	144
Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys	
35 40 45	

ccc gcc gtg tac aac tac ccc gag ggc gcc gcc tac gag ttc aac gcc	192
Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala	
50 55 60	

gcg gcc gcc gcc aac gcg cag gtc tac ggt cag acc ggc ctc ccc tac	240
Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr	
65 70 75 80	

ggc ccc ggg tct gag gct gcg gcg ttc ggc tcc aac ggc ctg ggg ggt	288
Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly	
85 90 95	

ttc ccc cca ctc aac agc gtg tct ccg agc ccg ctg atg cta ctg cac	336
Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His	
100 105 110	

ccg ccg ccg cag ctg tcg cct ttc ctg cag ccc cac ggc cag cag gtg	384
Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val	
115 120 125	

ccc tac tac ctg gag aac gag ccc agc ggc tac acg gtg cgc gag gcc	432
Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala	
130 135 140	

ggc ccg ccg gca ttc tac agg cca aat tca gat aat cga cgc cag ggt Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly 145 150 155 160	480
ggc aga gaa aga ttg gcc agt acc aat gac aag gga agt atg gct atg Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met 165 170 175	528
gaa tct gcc aag gag act cgc tac tgt gca gtg tgc aat gac tat gct Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala 180 185 190	576
tca ggc tac cat tat gga gtc tgg tcc tgt gag ggc tgc aag gcc ttc Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe 195 200 205	624
ttc aag aga agt att caa gga cat aac gac tat atg tgt cca gcc acc Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr 210 215 220	672
aac cag tgc acc att gat aaa aac agg agg aag agc tgc cag gcc tgc Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys 225 230 235 240	720
cgg ctc cgc aaa tgc tac gaa gtg gga atg atg aaa ggt ggg ata cga Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg 245 250 255	768
aaa gac cga aga gga ggg aga atg ttg aaa cac aag cgc cag aga gat Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp 260 265 270	816
gat ggg gag ggc agg ggt gaa gtg ggg tct gct gga gac atg aga gct Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala 275 280 285	864
gcc aac ctt tgg cca agc ccg ctc atg atc aaa cgc tct aag aag aac Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn 290 295 300	912
agc ctg gcc ttg tcc ctg acg gcc gac cag atg gtc agt gcc ttg ttg Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu 305 310 315 320	960
gat gct gag ccc ccc ata ctc tat tcc gag tat gat cct acc aga ccc Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro 325 330 335	1008
ttc agt gaa gct tgc atg atg ggc tta ctg acc aac ctg gca gac agg Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg 340 345 350	1056
gag ctg gtt cac atg atc aac tgg gcg aag agg gtg cca gcc ttt gtg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val 355 360 365	1104
gat ttg acc ctc cat gat cag gtc cac ctt cta gaa tgt gcc tgg cta Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu 370 375 380	1152

gag atc ctg atg att ggt ctc gtc tgg cgc tcc atg gag cac cca ggg	1200
Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly	
385 390 395 400	
aag cta ctg ttt gct cct aac ttg ctc ttg gac agg aac cag gga aaa	1248
Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys	
405 410 415	
tgt gta gag ggc atg gtg gag atc ttc gac atg ctg ctg gct aca tca	1296
Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser	
420 425 430	
tct cgg ttc cgc atg atg aat ctg cag gga gag gag ttt gtg tgc ctc	1344
Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu	
435 440 445	
aaa tct att att ttg ctt aat tct gga gtg tac aca ttt ctg tcc agc	1392
Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser	
450 455 460	
acc ctg aag tct ctg gaa gag aag gac cat atc cac cga gtc ctg gac	1440
Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp	
465 470 475 480	
aag atc aca gac act ttg atc cac ctg atg gcc aag gca ggc ctg acc	1488
Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr	
485 490 495	
ctg cag cag cag cac cag cgg ctg gcc cag ctc ctc ctc atc ctc tcc	1536
Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser	
500 505 510	
cac atc agg cac atg agt aac aaa ggc atg gag cat ctg tac agc atg	1584
His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met	
515 520 525	
aag tgc aag aac gtg gtg ccc ctc tat gac ctg ctg ctg gag atg ctg	1632
Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu	
530 535 540	
gac gcc cac cgc cta cat gcg ccc act agc cgt gga ggg gca tcc gtg	1680
Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val	
545 550 555 560	
gag gag acg gac caa agc cac ttg gcc act gcg ggc tct act tca tcg	1728
Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser	
565 570 575	
cat tcc ttg caa aag tat tac atc acg ggg gag gca gag ggt ttc cct	1776
His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro	
580 585 590	
gcc aca gtc tga	1788
Ala Thr Val	
595	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 595

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His  
 1 5 10 15  
 Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys  
 20 25 30  
 Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys  
 35 40 45  
 Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala  
 50 55 60  
 Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr  
 65 70 75 80  
 Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly  
 85 90 95  
 Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His  
 100 105 110  
 Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val  
 115 120 125  
 Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met  
 165 170 175  
 Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala  
 180 185 190  
 Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe  
 195 200 205  
 Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr  
 210 215 220  
 Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys  
 225 230 235 240  
 Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg  
 245 250 255  
 Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp  
 260 265 270  
 Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala  
 275 280 285  
 Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn  
 290 295 300  
 Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu  
 305 310 315 320

Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro  
 325 330 335  
 Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg  
 340 345 350  
 Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val  
 355 360 365  
 Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu  
 370 375 380  
 Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys  
 405 410 415  
 Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser  
 420 425 430  
 Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu  
 435 440 445  
 Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser  
 450 455 460  
 Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp  
 465 470 475 480  
 Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr  
 485 490 495  
 Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser  
 500 505 510  
 His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met  
 515 520 525  
 Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu  
 530 535 540  
 Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val  
 545 550 555 560  
 Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser  
 565 570 575  
 His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro  
 580 585 590  
 Ala Thr Val  
 595

<210> 3

<211> 1983

<212> ADN

<213> Séquence artificielle



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1983)

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence  
chimérique Homosapiens-Bacteriophage P1

&lt;400&gt; 3

atg tcc aat tta ctg acc gta cac caa aat ttg cct gca tta ccg gtc	48
Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val	
1 5 10 15	
gat gca acg agt gat gag gtt cgc aag aac ctg atg gac atg ttc agg	96
Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg	
20 25 30	
gat cgc cag gcg ttt tct gag cat acc tgg aaa atg ctt ctg tcc gtt	144
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val	
35 40 45	
tgc cgg tcg tgg gcg gca tgg tgc aag ttg aat aac cgg aaa tgg ttt	192
Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe	
50 55 60	
ccc gca gaa cct gaa gat gtt cgc gat tat ctt cta tat ctt cag gcg	240
Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala	
65 70 75 80	
cgc ggt ctg gca gta aaa act atc cag caa cat ttg ggc cag cta aac	288
Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn	
85 90 95	
atg ctt cat cgt cgg tcc ggg ctg cca cga cca agt gac agc aat gct	336
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala	
100 105 110	
gtt tca ctg gtt atg cgg cgg atc cga aaa gaa aac gtt gat gcc ggt	384
Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly	
115 120 125	
gaa cgt gca aaa cag gct cta gcg ttc gaa cgc act gat ttc gac cag	432
Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln	
130 135 140	
gtt cgt tca ctc atg gaa aat agc gat cgc tgc cag gat ata cgt aat	480
Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn	
145 150 155 160	
ctg gca ttt ctg ggg att gct tat aac acc ctg tta cgt ata gcc gaa	528
Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu	
165 170 175	
att gcc agg atc agg gtt aaa gat atc tca cgt act gac ggt ggg aga	576
Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg	
180 185 190	
atg tta atc cat att ggc aga acg aaa acg ctg gtt agc acc gca ggt	624
Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly	
195 200 205	

gta gag aag gca ctt agc ctg ggg gta act aaa ctg gtc gag cga tgg	672
Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp	
210 215 220	
att tcc gtc tct ggt gta gct gat gat ccg aat aac tac ctg ttt tgc	720
Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys	
225 230 235 240	
cgg gtc aga aaa aat ggt gtt gcc gcg cca tct gcc acc agc cag cta	768
Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu	
245 250 255	
tca act cgc gcc ctg gaa ggg att ttt gaa gca act cat cga ttg att	816
Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile	
260 265 270	
tac ggc gct aag gat gac tct ggt cag aga tac ctg gcc tgg tct gga	864
Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly	
275 280 285	
cac agt gcc cgt gtc gga gcc gcg cga gat atg gcc cgc gct gga gtt	912
His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val	
290 295 300	
tca ata ccg gag atc atg caa gct ggt ggc tgg acc aat gta aat att	960
Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile	
305 310 315 320	
gtc atg aac tat atc cgt aac ctg gat agt gaa aca ggg gca atg gtg	1008
Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val	
325 330 335	
cgc ctg ctg gaa gat ggc gat ctc gag cca tct gct gga gac atg aga	1056
Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Leu Glu Pro Ser Ala Gly Asp Met Arg	
340 345 350	
gct gcc aac ctt tgg cca agc ccg ctc atg atc aaa cgc tct aag aag	1104
Ala Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys	
355 360 365	
aac agc ctg gcc ttg tcc ctg acg gcc gac cag atg gtc agt gcc ttg	1152
Asn Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu	
370 375 380	
ttg gat gct gag ccc ccc ata ctc tat tcc gag tat gat cct acc aga	1200
Leu Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg	
385 390 395 400	
ccc ttc agt gaa gct tcg atg atg ggc tta ctg acc aac ctg gca gac	1248
Pro Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp	
405 410 415	
agg gag ctg gtt cac atg atc aac tgg gcg aag agg gtg cca ggc ttt	1296
Arg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe	
420 425 430	
gtg gat ttg acc ctc cat gat cag gtc cac ctt cta gaa tgt gcc tgg	1344
Val Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Cys Ala Trp	
435 440 445	

cta gag atc ctg atg att ggt ctc gtc tgg cgc tcc atg gag cac cca Leu Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro 450 455 460	1392
ggg aag cta ctg ttt gct cct aac ttg ctc ttg gac agg aac cag gga Gly Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly 465 470 475 480	1440
aaa tgt gta gag ggc atg gtg gag atc ttc gac atg ctg ctg gct aca Lys Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr 485 490 495	1488
tca tct cgg ttc cgc atg atg aat ctg cag gga gag gag ttt gtg tgc Ser Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys 500 505 510	1536
ctc aaa tct att att ttg ctt aat tct gga gtg tac aca ttt ctg tcc Leu Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser 515 520 525	1584
agc acc ctg aag tct ctg gaa gag aag gac cat atc cac cga gtc ctg Ser Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu 530 535 540	1632
gac aag atc aca gac act ttg atc cac ctg atg gcc aag gca ggc ctg Asp Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu 545 550 555 560	1680
acc ctg cag cag cag cac cag cgg ctg gcc cag ctc ctc ctc atc ctc Thr Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu 565 570 575	1728
tcc cac atc agg cac atg agt aac aaa aga atg gag cat ctg tac agc Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Arg Met Glu His Leu Tyr Ser 580 585 590	1776
atg aag tgc aag aac gtg gtg ccc ctc tat gac ctg ctg ctg gag atg Met Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met 595 600 605	1824
ctg gac gcc cac cgc cta cat gcg ccc act agc cgt gga ggg gca tcc Leu Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser 610 615 620	1872
gtg gag gag acg gac caa agc cac ttg gcc act gcg ggc tct act tca Val Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser 625 630 635 640	1920
tcg cat tcc ttg caa aag tat tac atc acg ggg gag gca gag ggt ttc Ser His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe 645 650 655	1968
cct gcc aca gtc tga Pro Ala Thr Val 660	1983

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 660

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<400> 4

Met 1	Ser	Asn	Leu	Leu 5	Thr	Val	His	Gln	Asn 10	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro 15	Val
Asp	Ala	Thr	Ser 20	Asp	Glu	Val	Arg	Lys 25	Asn	Leu	Met	Asp	Met 30	Phe	Arg
Asp	Arg	Gln 35	Ala	Phe	Ser	Glu	His 40	Thr	Trp	Lys	Met	Leu 45	Leu	Ser	Val
Cys 50	Arg	Ser	Trp	Ala	Ala	Trp 55	Cys	Lys	Leu	Asn 60	Asn	Arg	Lys	Trp	Phe
Pro 65	Ala	Glu	Pro	Glu	Asp 70	Val	Arg	Asp	Tyr	Leu 75	Leu	Tyr	Leu	Gln	Ala 80
Arg	Gly	Leu	Ala	Val 85	Lys	Thr	Ile	Gln 90	Gln	His	Leu	Gly	Gln	Leu 95	Asn
Met	Leu	His	Arg 100	Arg	Ser	Gly	Leu	Pro 105	Arg	Pro	Ser	Asp	Ser 110	Asn	Ala
Val	Ser	Leu 115	Val	Met	Arg	Arg	Ile 120	Arg	Lys	Glu	Asn 125	Val	Asp	Ala	Gly
Glu 130	Arg	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu 135	Ala	Phe	Glu	Arg	Thr 140	Asp	Phe	Asp	Gln
Val 145	Arg	Ser	Leu	Met	Glu 150	Asn	Ser	Asp	Arg	Cys 155	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn 160
Leu	Ala	Phe	Leu 165	Gly	Ile	Ala	Tyr	Asn 170	Thr	Leu	Leu	Arg	Ile 175	Ala	Glu
Ile	Ala	Arg	Ile 180	Arg	Val	Lys	Asp 185	Ile	Ser	Arg	Thr	Asp	Gly 190	Gly	Arg
Met	Leu	Ile 195	His	Ile	Gly	Arg	Thr 200	Lys	Thr	Leu	Val	Ser 205	Thr	Ala	Gly
Val 210	Glu	Lys	Ala	Leu	Ser	Leu 215	Gly	Val	Thr	Lys	Leu 220	Val	Glu	Arg	Trp
Ile 225	Ser	Val	Ser	Gly	Val 230	Ala	Asp	Asp	Pro	Asn 235	Asn	Tyr	Leu	Phe	Cys 240
Arg	Val	Arg	Lys 245	Asn	Gly	Val	Ala	Ala	Pro 250	Ser	Ala	Thr	Ser	Gln 255	Leu
Ser	Thr	Arg	Ala 260	Leu	Glu	Gly	Ile	Phe 265	Glu	Ala	Thr	His	Arg 270	Leu	Ile
Tyr	Gly	Ala 275	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly 280	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ala 285	Trp	Ser	Gly
His	Ser 290	Ala	Arg	Val	Gly 295	Ala	Ala	Arg	Asp	Met	Ala 300	Arg	Ala	Gly	Val

Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile  
 305 310 315 320  
 Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val  
 325 330 335  
 Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Leu Glu Pro Ser Ala Gly Asp Met Arg  
 340 345 350  
 Ala Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys  
 355 360 365  
 Asn Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu  
 370 375 380  
 Leu Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Pro Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp  
 405 410 415  
 Arg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe  
 420 425 430  
 Val Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp  
 435 440 445  
 Leu Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro  
 450 455 460  
 Gly Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly  
 465 470 475 480  
 Lys Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr  
 485 490 495  
 Ser Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys  
 500 505 510  
 Leu Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser  
 515 520 525  
 Ser Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu  
 530 535 540  
 Asp Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu  
 545 550 555 560  
 Thr Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu  
 565 570 575  
 Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Arg Met Glu His Leu Tyr Ser  
 580 585 590  
 Met Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met  
 595 600 605  
 Leu Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser  
 610 615 620  
 Val Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser

625                      630                      635                      640  
 Ser His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe  
                                 645                                  650                                  655

Pro Ala Thr Val  
                                 660

<210> 5  
 <211> 1983  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1983)

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: Séquence  
                                 chimérique Homosapiens-Bacteriophage P1

<400> 5  
 atg tcc aat tta ctg acc gta cac caa aat ttg cct gca tta ccg gtc 48  
 Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val  
   1                                5                                10                                15  
 gat gca acg agt gat gag gtt cgc aag aac ctg atg gac atg ttc agg 96  
 Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg  
                                 20                                25                                30  
 gat cgc cag gcg ttt tct gag cat acc tgg aaa atg ctt ctg tcc gtt 144  
 Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val  
                                 35                                40                                45  
 tgc cgg tcg tgg gcg gca tgg tgc aag ttg aat aac cgg aaa tgg ttt 192  
 Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe  
                                 50                                55                                60  
 ccc gca gaa cct gaa gat gtt cgc gat tat ctt cta tat ctt cag gcg 240  
 Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala  
   65                                70                                75                                80  
 cgc ggt ctg gca gta aaa act atc cag caa cat ttg ggc cag cta aac 288  
 Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn  
                                 85                                90                                95  
 atg ctt cat cgt cgg tcc ggg ctg cca cga cca agt gac agc aat gct 336  
 Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala  
                                 100                                105                                110  
 gtt tca ctg gtt atg cgg cgg atc cga aaa gaa aac gtt gat gcc ggt 384  
 Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly  
                                 115                                120                                125  
 gaa cgt gca aaa cag gct cta gcg ttc gaa cgc act gat ttc gac cag 432  
 Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln  
   130                                135                                140  
 gtt cgt tca ctc atg gaa aat agc gat cgc tgc cag gat ata cgt aat 480

Val 145	Arg	Ser	Leu	Met	Glu 150	Asn	Ser	Asp	Arg	Cys 155	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn 160	
ctg	gca	ttt	ctg	ggg	att	gct	tat	aac	acc	ctg	tta	cgt	ata	gcc	gaa	528
Leu	Ala	Phe	Leu	Gly	Ile	Ala	Tyr	Asn	Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Ala	Glu	
				165					170					175		
att	gcc	agg	atc	agg	gtt	aaa	gat	atc	tca	cgt	act	gac	ggg	ggg	aga	576
Ile	Ala	Arg	Ile	Arg	Val	Lys	Asp	Ile	Ser	Arg	Thr	Asp	Gly	Gly	Arg	
			180					185					190			
atg	tta	atc	cat	att	ggc	aga	acg	aaa	acg	ctg	gtt	agc	acc	gca	ggg	624
Met	Leu	Ile	His	Ile	Gly	Arg	Thr	Lys	Thr	Leu	Val	Ser	Thr	Ala	Gly	
			195				200					205				
gta	gag	aag	gca	ctt	agc	ctg	ggg	gta	act	aaa	ctg	gtc	gag	cga	tgg	672
Val	Glu	Lys	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Thr	Lys	Leu	Val	Glu	Arg	Trp	
	210					215					220					
att	tcc	gtc	tct	ggg	gta	gct	gat	gat	ccg	aat	aac	tac	ctg	ttt	tgc	720
Ile	Ser	Val	Ser	Gly	Val	Ala	Asp	Asp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Leu	Phe	Cys	
225					230					235					240	
cgg	gtc	aga	aaa	aat	ggg	gtt	gcc	gcg	cca	tct	gcc	acc	agc	cag	cta	768
Arg	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Gln	Leu	
				245					250					255		
tca	act	cgc	gcc	ctg	gaa	ggg	att	ttt	gaa	gca	act	cat	cga	ttg	att	816
Ser	Thr	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Phe	Glu	Ala	Thr	His	Arg	Leu	Ile	
			260					265					270			
tac	ggc	gct	aag	gat	gac	tct	ggg	cag	aga	tac	ctg	gcc	tgg	tct	gga	864
Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ala	Trp	Ser	Gly	
		275					280					285				
cac	agt	gcc	cgt	gtc	gga	gcc	gcg	cga	gat	atg	gcc	cgc	gct	gga	gtt	912
His	Ser	Ala	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Met	Ala	Arg	Ala	Gly	Val	
	290					295					300					
tca	ata	ccg	gag	atc	atg	caa	gct	ggg	ggc	tgg	acc	aat	gta	aat	att	960
Ser	Ile	Pro	Glu	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gly	Trp	Thr	Asn	Val	Asn	Ile	
305					310					315					320	
gtc	atg	aac	tat	atc	cgt	aac	ctg	gat	agt	gaa	aca	ggg	gca	atg	gtg	1008
Val	Met	Asn	Tyr	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Gly	Ala	Met	Val	
				325					330				335			
cgc	ctg	ctg	gaa	gat	ggc	gat	ctc	gag	cca	tct	gct	gga	gac	atg	aga	1056
Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp	Leu	Glu	Pro	Ser	Ala	Gly	Asp	Met	Arg	
			340					345					350			
gct	gcc	aac	ctt	tgg	cca	agc	ccg	ctc	atg	atc	aaa	cgc	tct	aag	aag	1104
Ala	Ala	Asn	Leu	Trp	Pro	Ser										

385	390	395	400	
ccc ttc agt gaa gct tcg atg atg ggc tta ctg acc aac ctg gca gac Pro Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp 405 410 415				1248
agg gag ctg gtt cac atg atc aac tgg gcg aag agg gtg cca ggc ttt Arg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe 420 425 430				1296
gtg gat ttg acc ctc cat gat cag gtc cac ctt cta gaa tgt gcc tgg Val Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp 435 440 445				1344
cta gag atc ctg atg att ggt ctc gtc tgg cgc tcc atg gag cac cca Leu Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro 450 455 460				1392
gtg aag cta ctg ttt gct cct aac ttg ctc ttg gac agg aac cag gga Val Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly 465 470 475 480				1440
aaa tgt gta gag ggc atg gtg gag atc ttc gac atg ctg ctg gct aca Lys Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr 485 490 495				1488
tca tct cgg ttc cgc atg atg aat ctg cag gga gag gag ttt gtg tgc Ser Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys 500 505 510				1536
ctc aaa tct att att ttg ctt aat tct gga gtg tac aca ttt ctg tcc Leu Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser 515 520 525				1584
agc acc ctg aag tct ctg gaa gag aag gac cat atc cac cga gtc ctg Ser Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu 530 535 540				1632
gac aag atc aca gac act ttg atc cac ctg atg gcc aag gca ggc ctg Asp Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu 545 550 555 560				1680
acc ctg cag cag cag cac cag cgg ctg gcc cag ctc ctc ctc atc ctc Thr Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu 565 570 575				1728
tcc cac atc agg cac atg agt aac aaa ggc atg gag cat ctg tac agc Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser 580 585 590				1776
atg aag tgc aag aac gtg gtg ccc ctc tat gac ctg ctg ctg gag gcg Met Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Ala 595 600 605				1824
gcg gac gcc cac cgc cta cat gcg ccc act agc cgt gga ggg gca tcc Ala Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser 610 615 620				1872
gtg gag gag acg gac caa agc cac ttg gcc act gcg ggc tct act tca Val Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser 625 630 635 640				1920



tcg cat tcc ttg caa aag tat tac atc acg ggg gag gca gag ggt ttc 1968  
 Ser His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe  
                   645                                  650                                  655

cct gcc aca gct tga  
 Pro Ala Thr Ala 1983  
                   660

<210> 6

<211> 660

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence  
 chimérique Homosapiens-Bacteriophage P1

<400> 6

Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val  
   1                                  5                                  10                                  15

Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg  
                   20                                  25                                  30

Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val  
                   35                                  40                                  45

Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe  
                   50                                  55                                  60

Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala  
                   65                                  70                                  75                                  80

Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn  
                   85                                  90                                  95

Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala  
                   100                                  105                                  110

Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly  
                   115                                  120                                  125

Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln  
                   130                                  135                                  140

Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn  
                   145                                  150                                  155                                  160

Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu  
                   165                                  170                                  175

Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg  
                   180                                  185                                  190

Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly  
                   195                                  200                                  205

Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp  
                   210                                  215                                  220

Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys

225	230	235	240
Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu	245	250	255
Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile	260	265	270
Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly	275	280	285
His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val	290	295	300
Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile	305	310	315
Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val	325	330	335
Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Leu Glu Pro Ser Ala Gly Asp Met Arg	340	345	350
Ala Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys	355	360	365
Asn Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu	370	375	380
Leu Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg	385	390	395
Pro Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp	405	410	415
Arg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe	420	425	430
Val Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp	435	440	445
Leu Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro	450	455	460
Val Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly	465	470	475
Lys Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr	485	490	495
Ser Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys	500	505	510
Leu Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser	515	520	525
Ser Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu	530	535	540
Asp Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu	545	550	555
			560

Thr Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu  
565 570 575

Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser  
580 585 590

Met Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Ala  
595 600 605

Ala Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser  
610 615 620

Val Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser  
625 630 635 640

Ser His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe  
645 650 655

Pro Ala Thr Ala  
660

<210> 7  
<211> 1983  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1983)

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence  
chimérique Homosapiens-Bacteriophage P1

<400> 7  
atg tcc aat tta ctg acc gta cac caa aat ttg cct gca tta ccg gtc 48  
Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val  
1 5 10 15

gat gca acg agt gat gag gtt cgc aag aac ctg atg gac atg ttc agg 96  
Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg  
20 25 30

gat cgc cag gcg ttt tct gag cat acc tgg aaa atg ctt ctg tcc gtt 144  
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val  
35 40 45

tgc cgg tcg tgg gcg gca tgg tgc aag ttg aat aac cgg aaa tgg ttt 192  
Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe  
50 55 60

ccc gca gaa cct gaa gat gtt cgc gat tat ctt cta tat ctt cag gcg 240  
Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala  
65 70 75 80

cgc ggt ctg gca gta aaa act atc cag caa cat ttg ggc cag cta aac 288  
Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn  
85 90 95

atg ctt cat cgt cgg tcc ggg ctg cca cga cca agt gac agc aat gct	336
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala	
100 105 110	
gtt tca ctg gtt atg cgg cgg atc cga aaa gaa aac gtt gat gcc ggt	384
Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly	
115 120 125	
gaa cgt gca aaa cag gct cta gcg ttc gaa cgc act gat ttc gac cag	432
Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln	
130 135 140	
gtt cgt tca ctc atg gaa aat agc gat cgc tgc cag gat ata cgt aat	480
Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn	
145 150 155 160	
ctg gca ttt ctg ggg att gct tat aac acc ctg tta cgt ata gcc gaa	528
Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu	
165 170 175	
att gcc agg atc agg gtt aaa gat atc tca cgt act gac ggt ggg aga	576
Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg	
180 185 190	
atg tta atc cat att ggc aga acg aaa acg ctg gtt agc acc gca ggt	624
Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly	
195 200 205	
gta gag aag gca ctt agc ctg ggg gta act aaa ctg gtc gag cga tgg	672
Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp	
210 215 220	
att tcc gtc tct ggt gta gct gat gat ccg aat aac tac ctg ttt tgc	720
Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys	
225 230 235 240	
cgg gtc aga aaa aat ggt gtt gcc gcg cca tct gcc acc agc cag cta	768
Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu	
245 250 255	
tca act cgc gcc ctg gaa ggg att ttt gaa gca act cat cga ttg att	816
Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile	
260 265 270	
tac ggc gct aag gat gac tct ggt cag aga tac ctg gcc tgg tct gga	864
Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly	
275 280 285	
cac agt gcc cgt gtc gga gcc gcg cga gat atg gcc cgc gct gga gtt	912
His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val	
290 295 300	
tca ata ccg gag atc atg caa gct ggt ggc tgg acc aat gta aat att	960
Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile	
305 310 315 320	
gtc atg aac tat atc cgt aac ctg gat agt gaa aca ggg gca atg gtg	1008
Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val	
325 330 335	

cgC ctg ctg gaa gat ggc gat ctC gag cca tct gct gga gac atg aga Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Leu Glu Pro Ser Ala Gly Asp Met Arg 340 345 350	1056
gct gcc aac ctt tgg cca agc ccg ctC atg atC aaa cgC tct aag aag Ala Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys 355 360 365	1104
aac agC ctg gcc ttg tcc ctg acg gcc gac cag atg gtc agt gcc ttg Asn Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu 370 375 380	1152
ttg gat gct gag ccc ccc ata ctC tat tcc gag tat gat cct acc aga Leu Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg 385 390 395 400	1200
ccc ttc agt gaa gct tCG atg atg ggc tta ctg acc aac ctg gca gac Pro Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp 405 410 415	1248
agg gag ctg gtt cac atg atC aac tgg gcg aag agg gtg cca ggc ttt Arg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe 420 425 430	1296
gtg gat ttg acc ctC cat gat cag gtc cac ctt cta gaa tgt gcc tgg Val Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp 435 440 445	1344
cta gag atC ctg atg att ggt ctC gtc tgg cgC tcc atg gag cac cca Leu Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro 450 455 460	1392
ggg aag cta ctg ttt gct cct aac ttg ctC ttg gac agg aac cag gga Gly Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly 465 470 475 480	1440
aaa tgt gta gag ggc atg gtg gag atC ttc gac atg ctg ctg gct aca Lys Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr 485 490 495	1488
tca tct cgG ttc cgC atg atg aat ctg cag gga gag gag ttt gtg tgc Ser Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys 500 505 510	1536
ctC aaa tct att att ttg ctt aat tct gga gtg tac aca ttt ctg tcc Leu Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser 515 520 525	1584
agC acc ctg aag tct ctg gaa gag aag gac cat atC cac cga gtc ctg Ser Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu 530 535 540	1632
gac aag atC aca gac act ttg atC cac ctg atg gcc aag gca ggc ctg Asp Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu 545 550 555 560	1680
acc ctg cag cag cag cac cag cgG ctg gcc cag ctC ctC ctC atC ctC Thr Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu 565 570 575	1728
tcc cac atC agg cac atg agt aac aaa ggc atg gag cat ctg tac agC	1776

Ser	His	Ile	Arg	His	Met	Ser	Asn	Lys	Gly	Met	Glu	His	Leu	Tyr	Ser		
580			585						590								
atg	aag	tgc	aag	aac	gtg	gtg	ccc	ctc	tat	gac	ctg	ctg	ctg	gag	gcg	1824	
Met	Lys	Cys	Lys	Asn	Val	Val	Pro	Leu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala		
595			600						605								
gcg	gac	gcc	cac	cgc	cta	cat	gcg	ccc	act	agc	cgt	gga	ggg	gca	tcc	1872	
Ala	Asp	Ala	His	Arg	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Ser	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser		
610			615						620								
gtg	gag	gag	acg	gac	caa	agc	cac	ttg	gcc	act	gcg	ggc	tct	act	tca	1920	
Val	Glu	Glu	Thr	Asp	Gln	Ser	His	Leu	Ala	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Ser		
625			630						635						640		
tcg	cat	tcc	ttg	caa	aag	tat	tac	atc	acg	ggg	gag	gca	gag	ggt	ttc	1968	
Ser	His	Ser	Leu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Glu	Ala	Glu	Gly	Phe		
645			650						655								
cct	gcc	aca	gct	tga											1983		
Pro	Ala	Thr	Ala														
660																	
<210> 8																	
<211> 660																	
<212> PRT																	
<213> Séquence artificielle																	
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence																	
chimérique Homosapiens-Bacteriophage P1																	
<400> 8																	
Met	Ser	Asn	Leu	Leu	Thr	Val	His	Gln	Asn	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Val		
1				5					10					15			
Asp	Ala	Thr	Ser	Asp	Glu	Val	Arg	Lys	Asn	Leu	Met	Asp	Met	Phe	Arg		
20			25						30								
Asp	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Glu	His	Thr	Trp	Lys	Met	Leu	Leu	Ser	Val		
35			40						45								
Cys	Arg	Ser	Trp	Ala	Ala	Trp	Cys	Lys	Leu	Asn	Asn	Arg	Lys	Trp	Phe		
50			55						60								
Pro	Ala	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Arg	Asp	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Leu	Gln	Ala		
65			70						75						80		
Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Thr	Ile	Gln	Gln	His	Leu	Gly	Gln	Leu	Asn		
85			90						95								
Met	Leu	His	Arg	Arg	Ser	Gly	Leu	Pro	Arg	Pro	Ser	Asp	Ser	Asn	Ala		
100			105						110								
Val	Ser	Leu	Val	Met	Arg	Arg	Ile	Arg	Lys	Glu	Asn	Val	Asp	Ala	Gly		
115			120						125								
Glu	Arg	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu	Ala	Phe	Glu	Arg	Thr	Asp	Phe	Asp	Gln		
130			135						140								
Val	Arg	Ser	Leu	Met	Glu	Asn	Ser	Asp	Arg	Cys	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn		
145			150						155						160		

Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu  
 165 170 175  
 Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg  
 180 185 190  
 Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly  
 195 200 205  
 Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp  
 210 215 220  
 Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys  
 225 230 235 240  
 Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu  
 245 250 255  
 Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile  
 260 265 270  
 Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly  
 275 280 285  
 His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val  
 290 295 300  
 Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile  
 305 310 315 320  
 Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val  
 325 330 335  
 Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Leu Glu Pro Ser Ala Gly Asp Met Arg  
 340 345 350  
 Ala Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys  
 355 360 365  
 Asn Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu  
 370 375 380  
 Leu Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Pro Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp  
 405 410 415  
 Arg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe  
 420 425 430  
 Val Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp  
 435 440 445  
 Leu Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro  
 450 455 460  
 Gly Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly  
 465 470 475 480

Lys Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr  
 485 490 495

Ser Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys  
 500 505 510

Leu Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser  
 515 520 525

Ser Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu  
 530 535 540

Asp Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu  
 545 550 555 560

Thr Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu  
 565 570 575

Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser  
 580 585 590

Met Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Ala  
 595 600 605

Ala Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser  
 610 615 620

Val Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser  
 625 630 635 640

Ser His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe  
 645 650 655

Pro Ala Thr Ala  
 660

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 tccttcacca agcacatctg

20

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
 tgcagccctc acaactgtat

20

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens



<400> 11  
caacctgcac ttgtcactta g

21

<210> 12  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
atgtttcata gttggatata

20

<210> 13  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 13  
atacgcggcc gcgaattcca gcaggaatca ggtagct

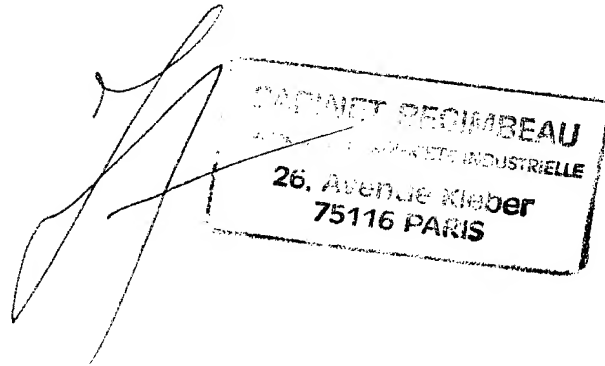
37

<210> 14  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 14  
atagcgccgg cgctgcagca caggaggggtg ctatgag

37

**ORIGINAL**



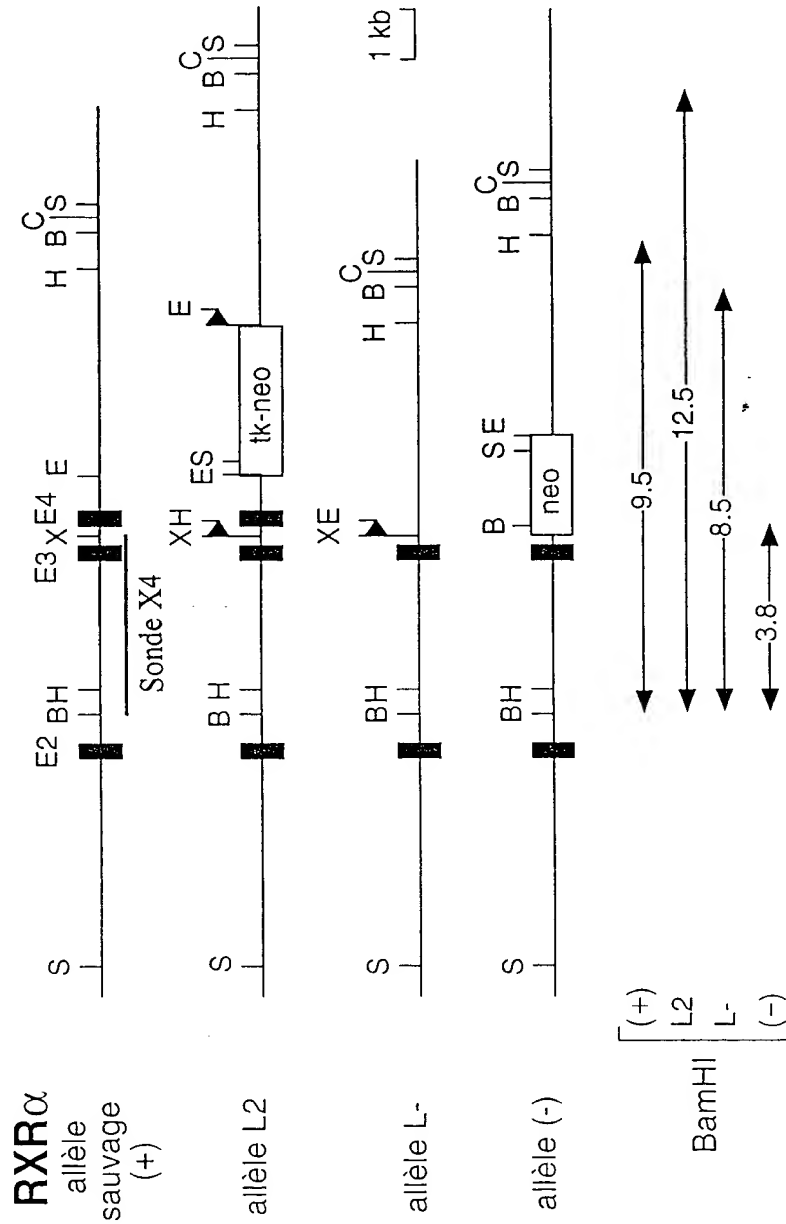


Figure 1A

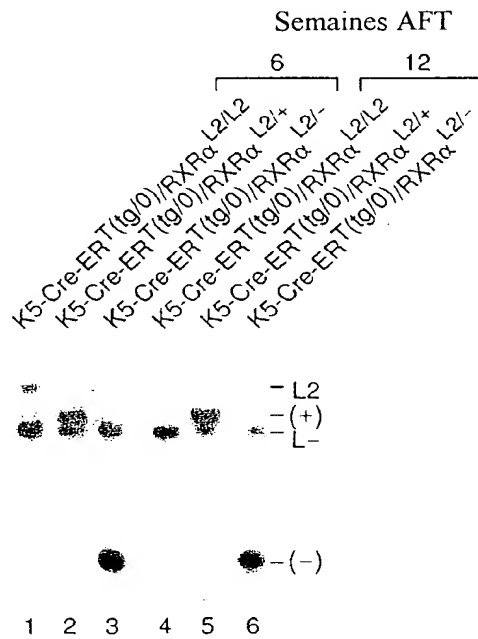


Figure 1B

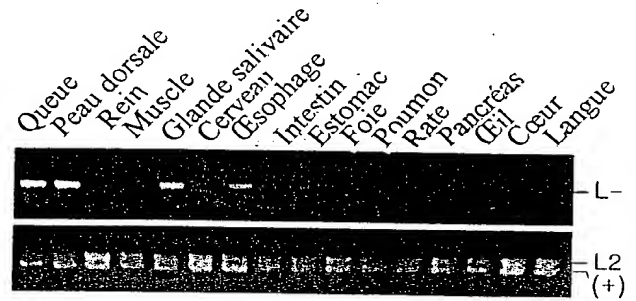


Figure 1C

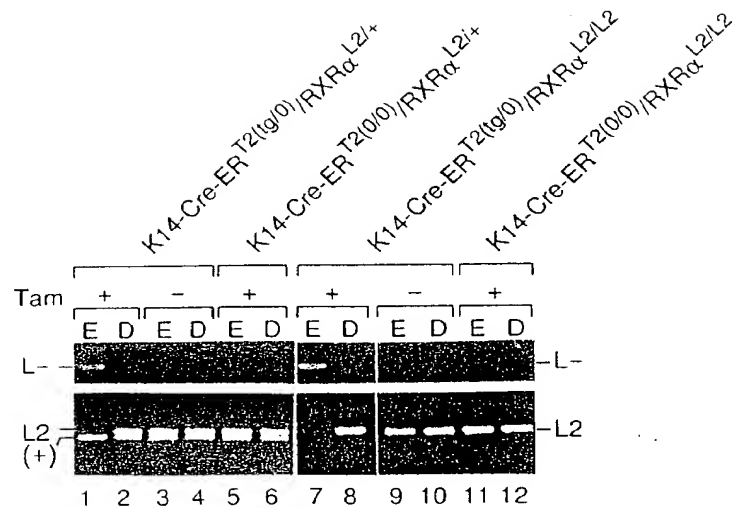


Figure 1D

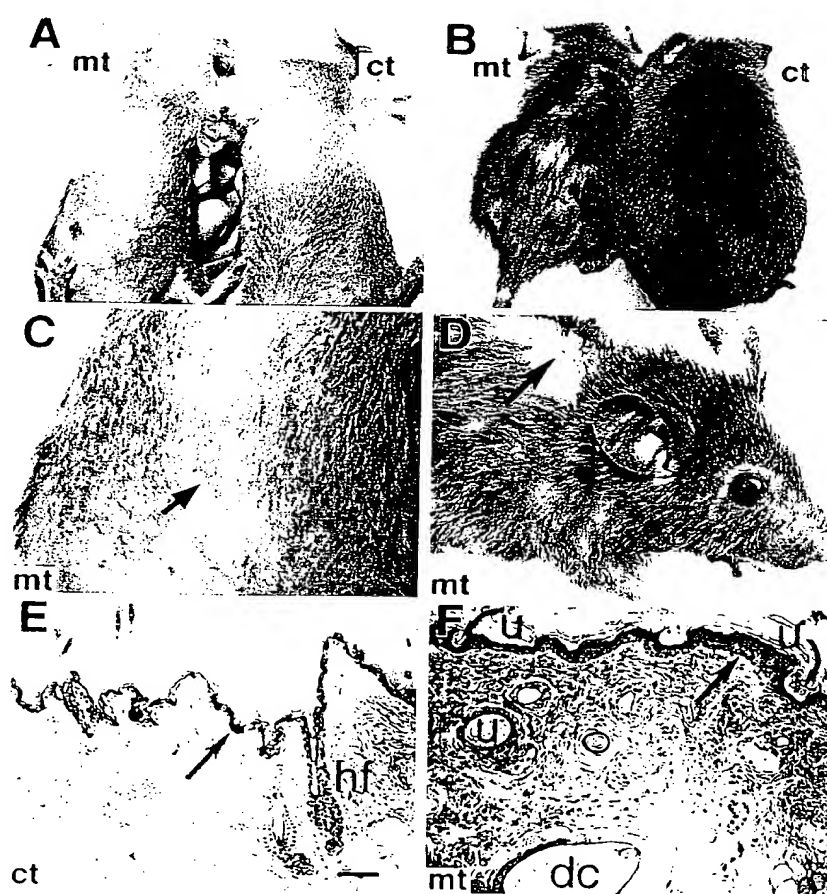


Figure 2a)

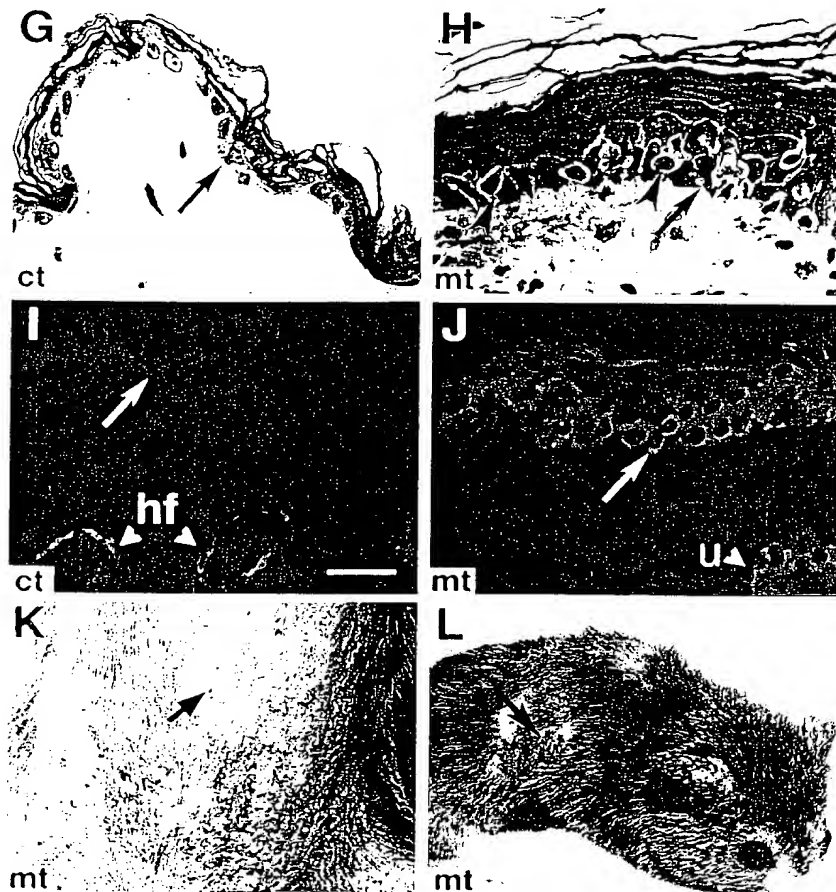


Figure 2b)

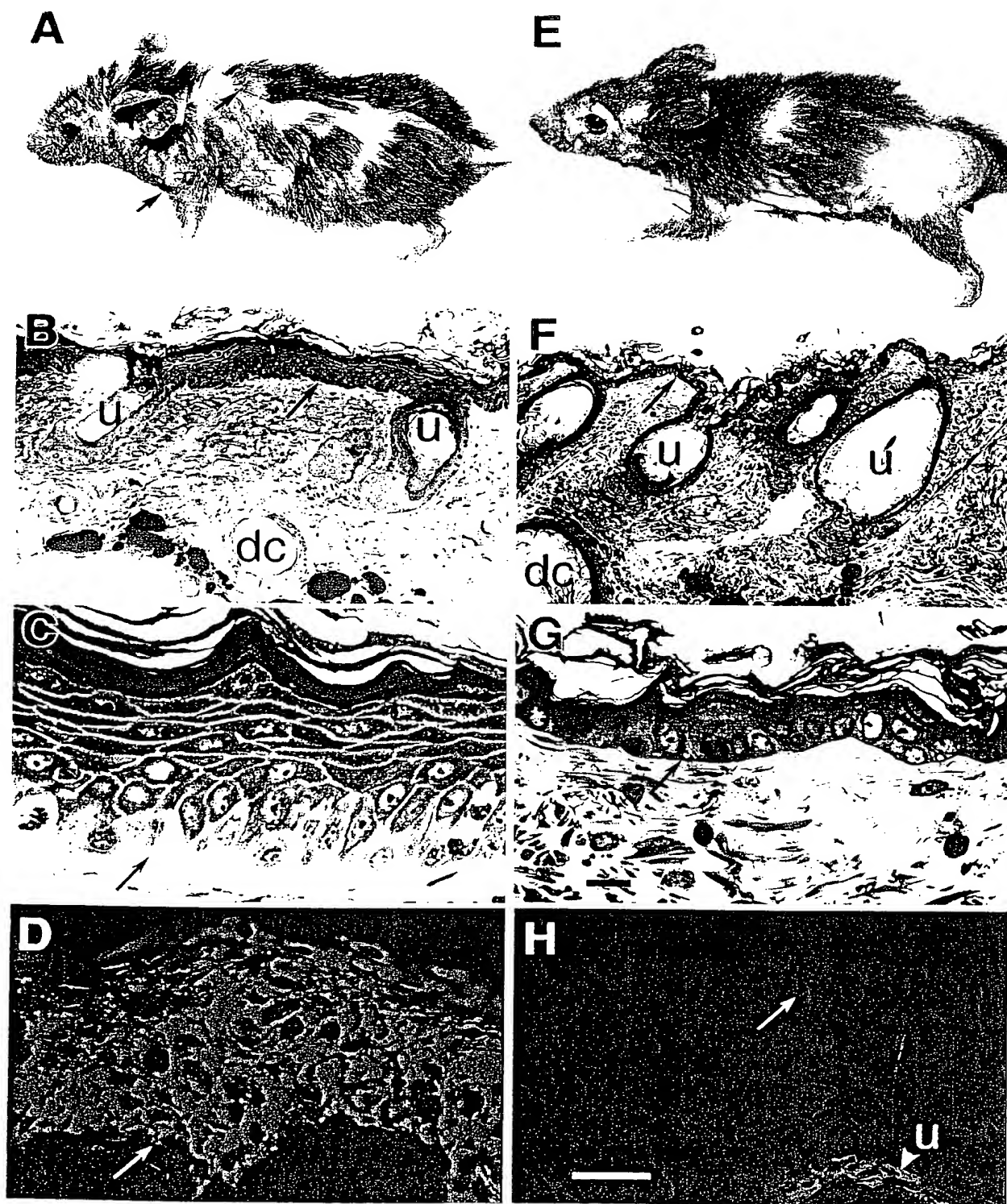


Figure 3

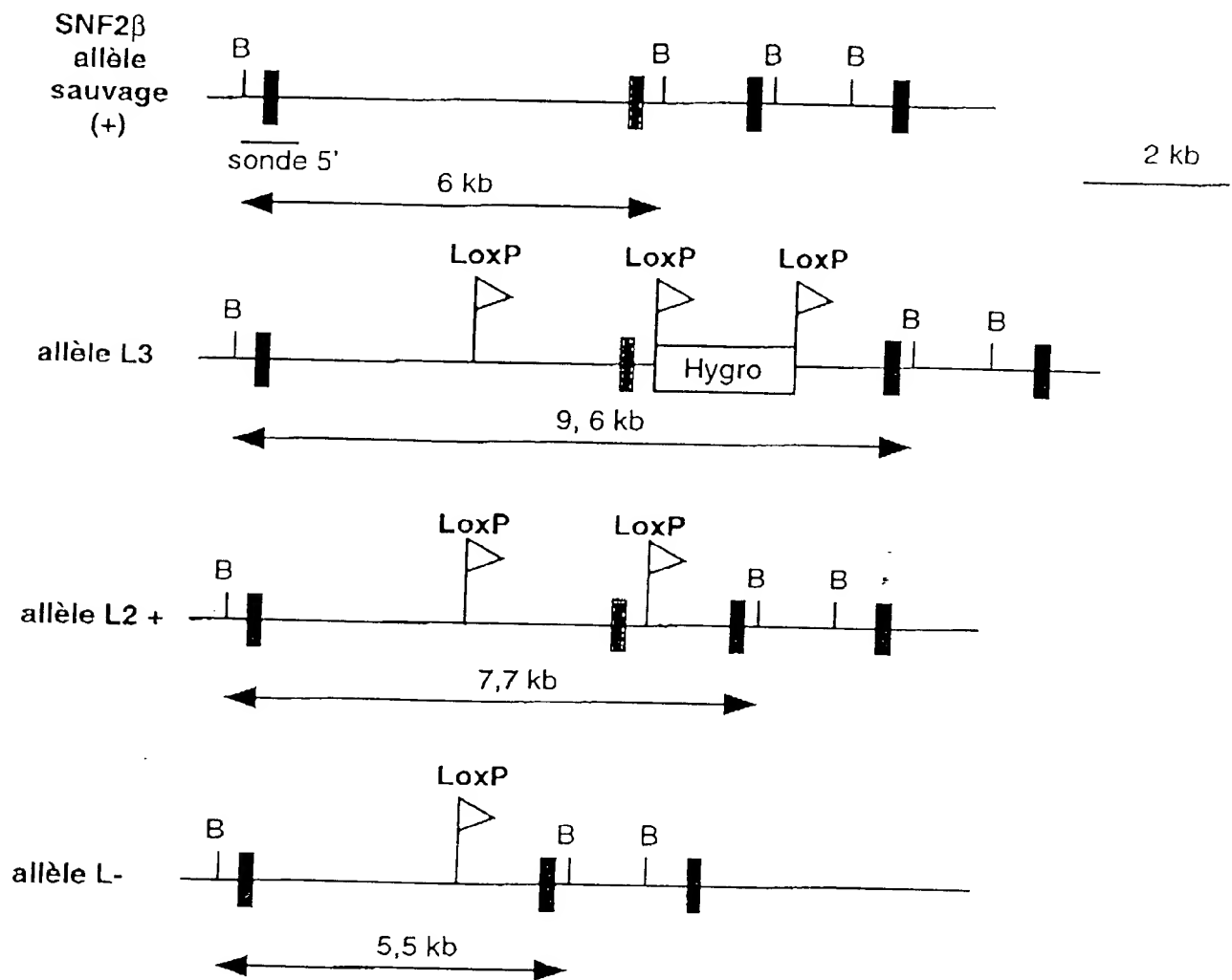


Figure 4A

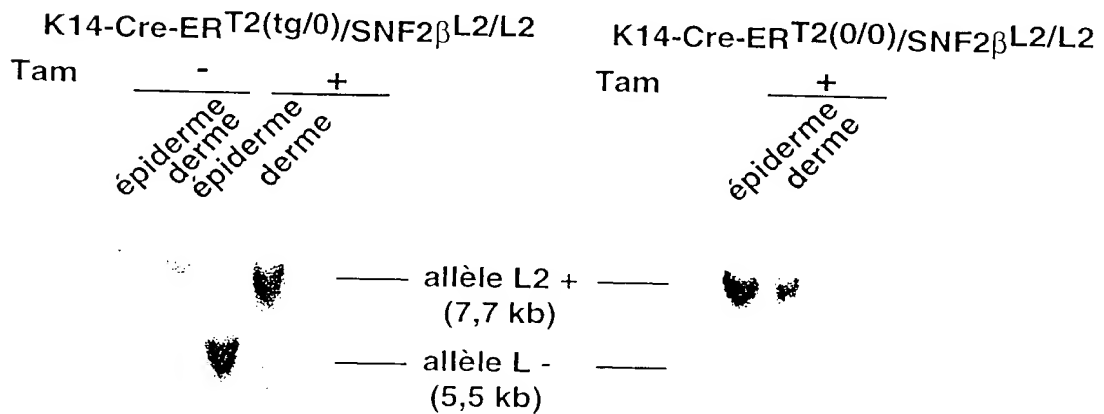


Figure 4B

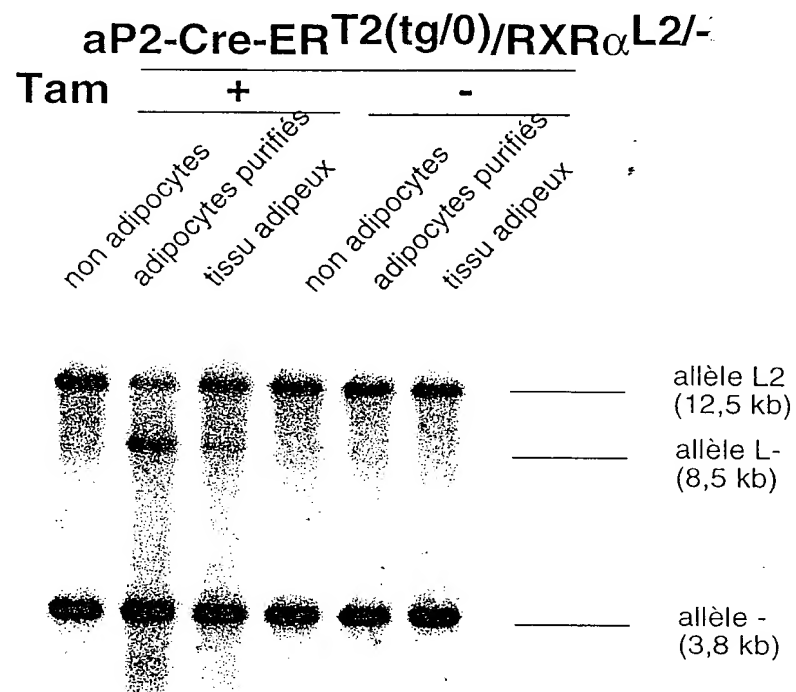


Figure 5



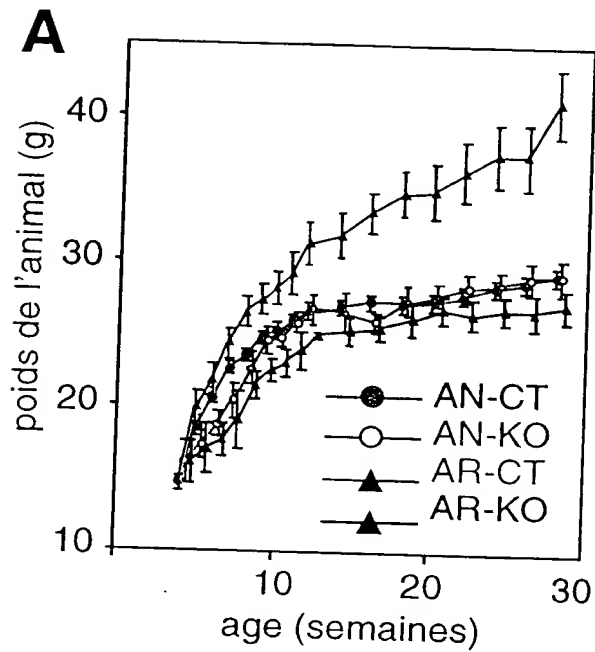


Figure 6A

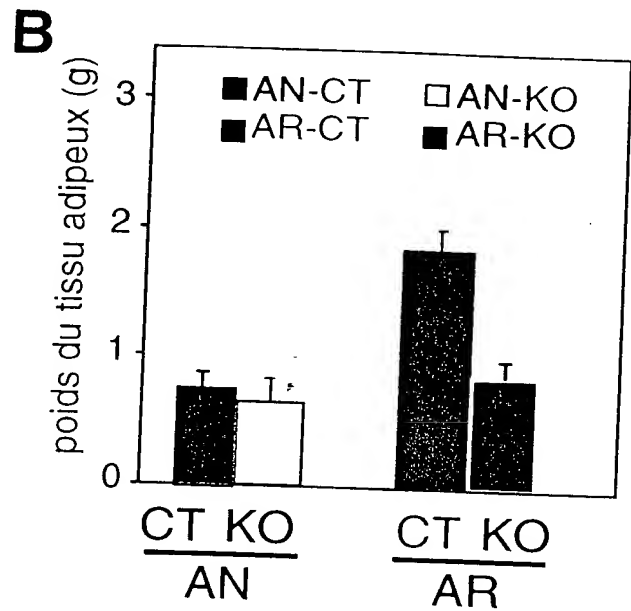


Figure 6B

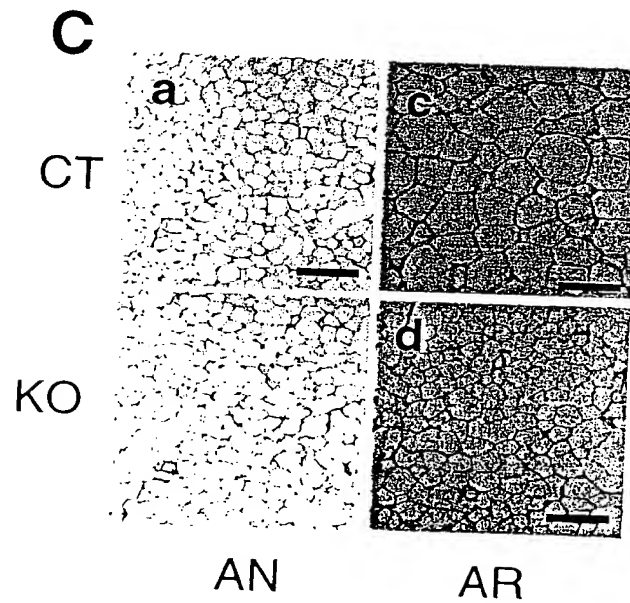


Figure 6C

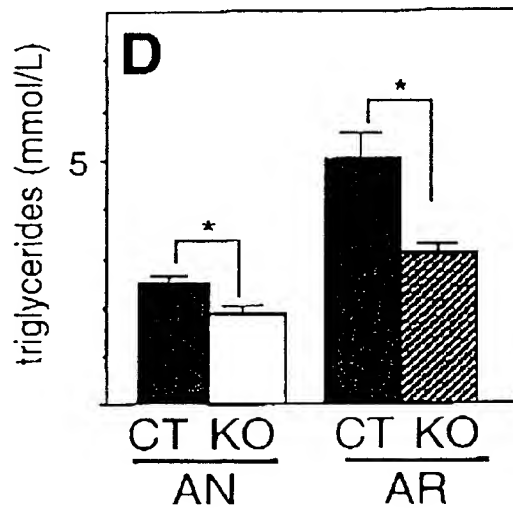


Figure 6D

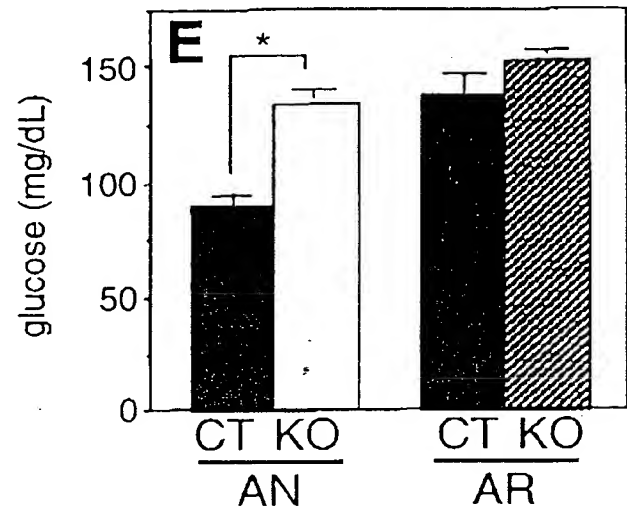


Figure 6E

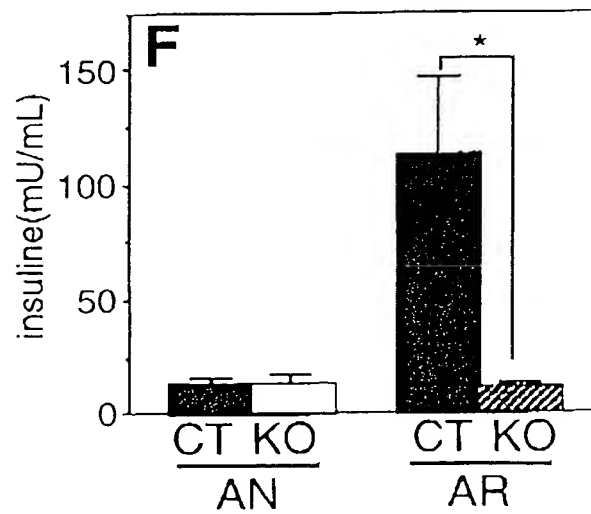


Figure 6F

$\alpha$ -AT-Cre-ERT(tg/0)/RXR $\alpha$ L2/L2

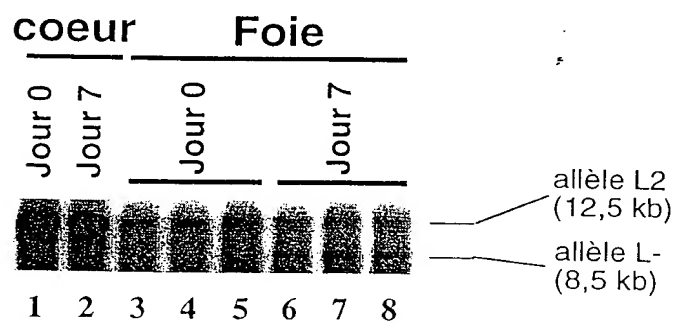


Figure 7

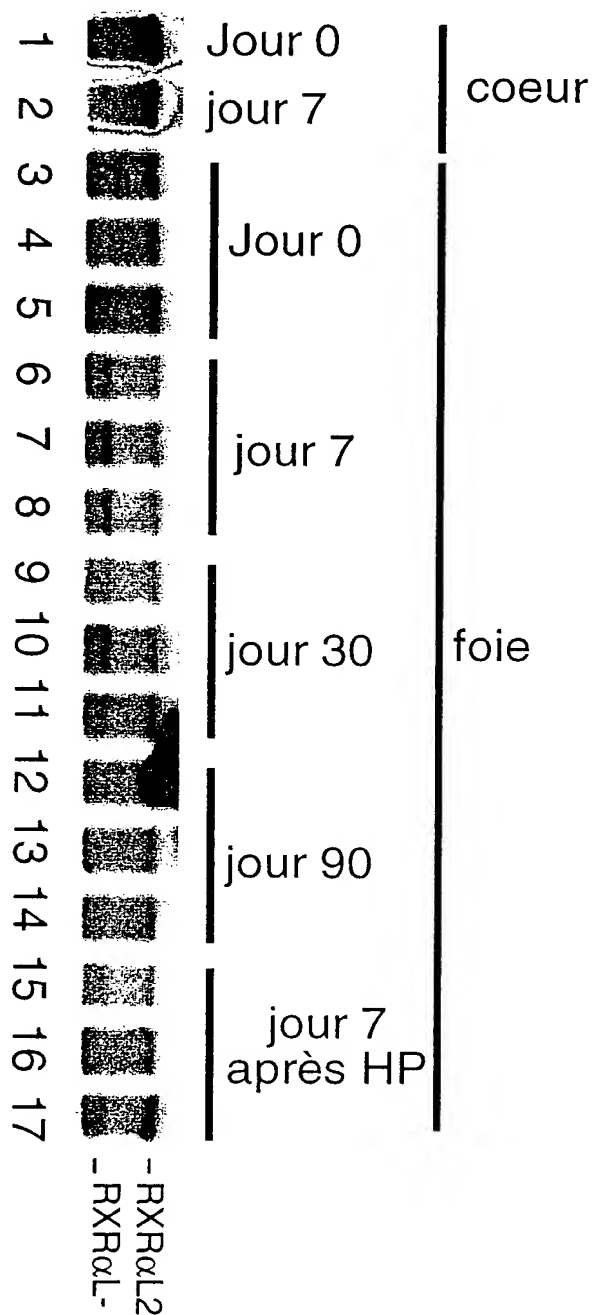


Figure 8

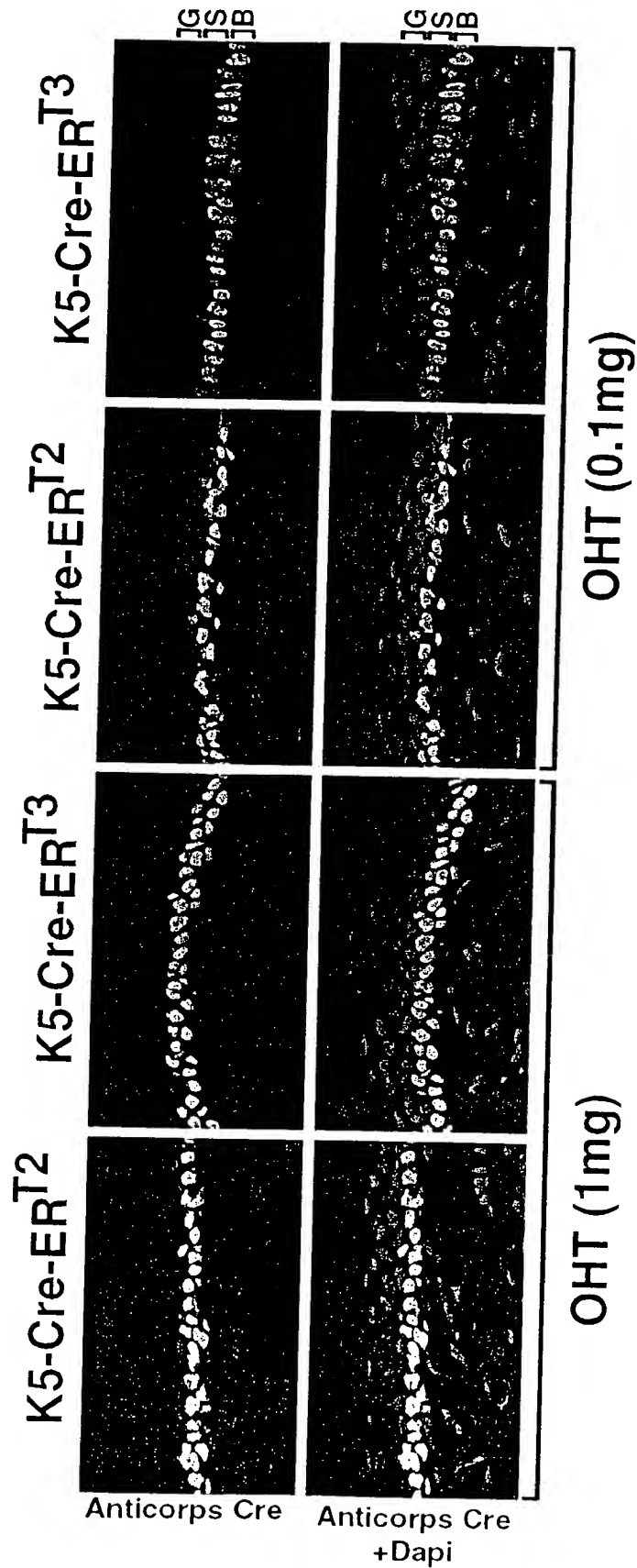


Figure 9

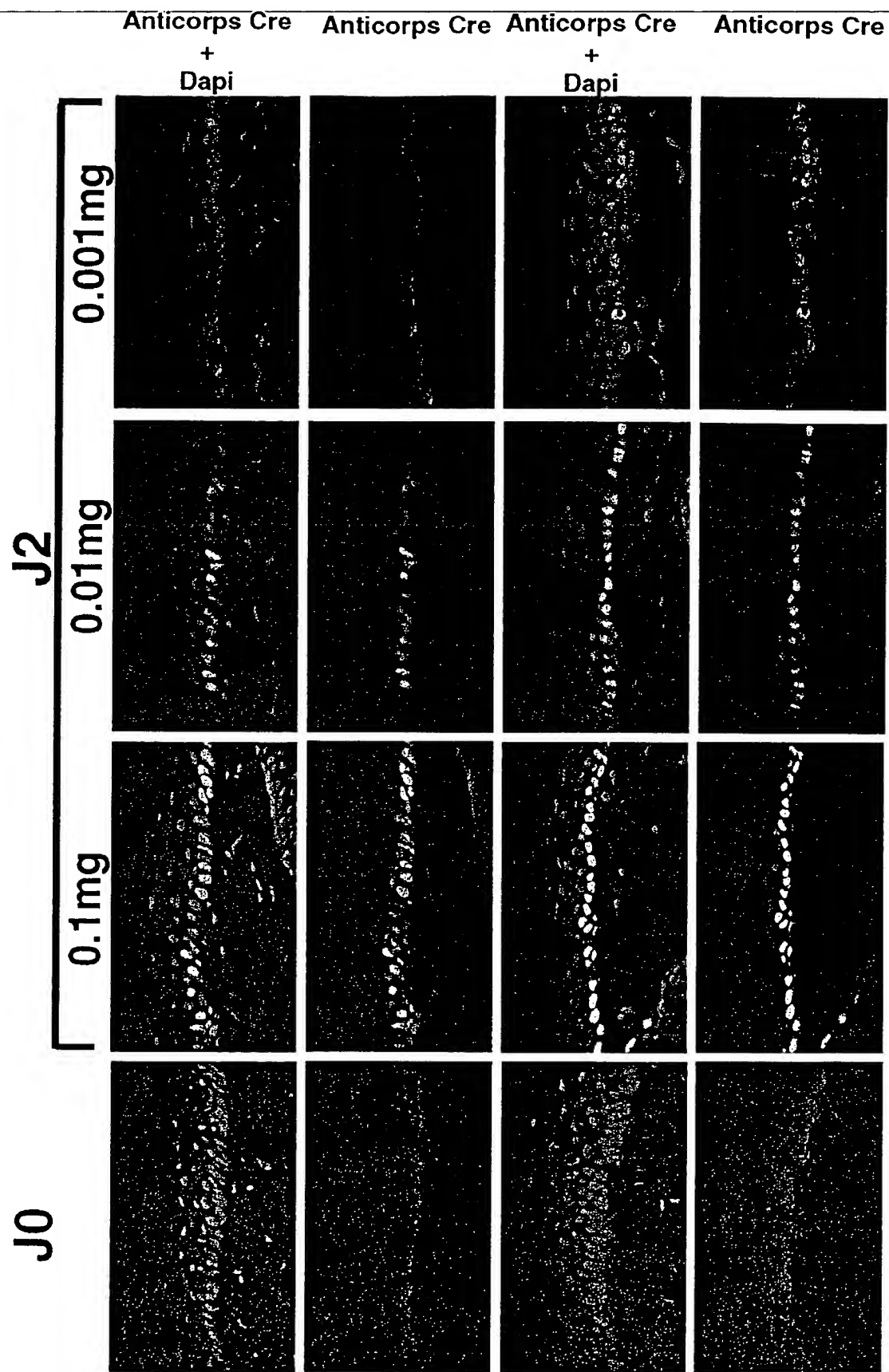
K5-Cre-ER<sup>T2</sup>K5-Cre-ER<sup>T3</sup>

Figure 10

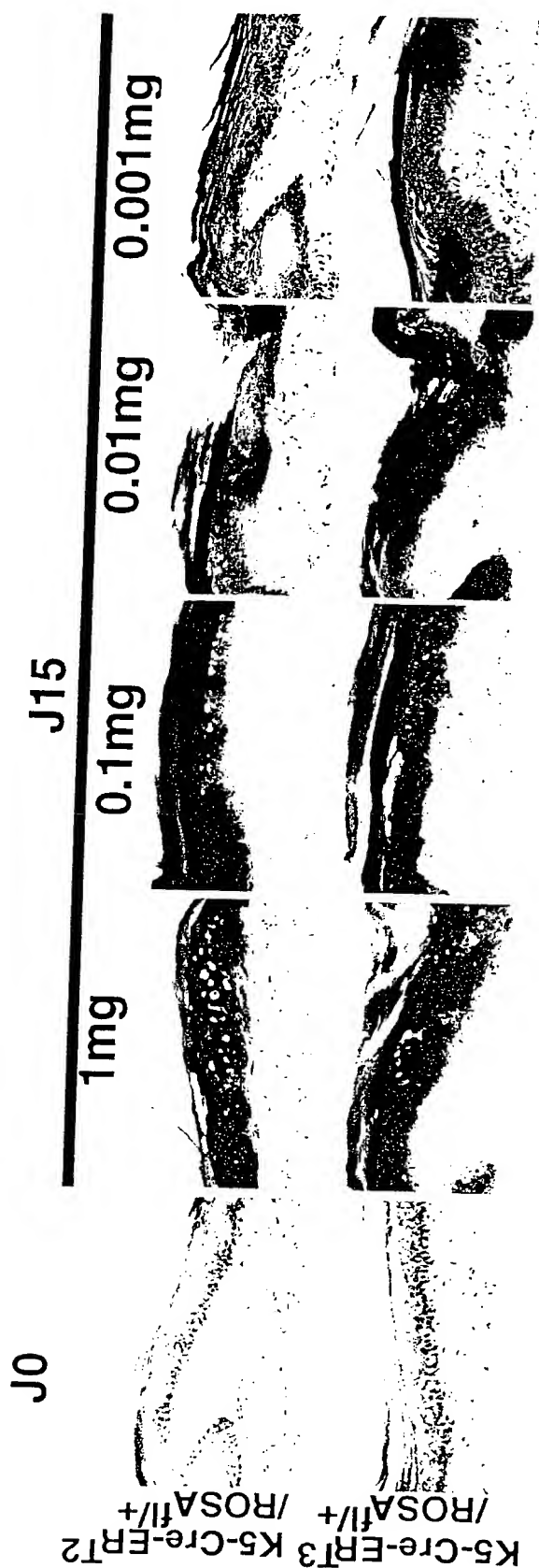


Figure 11

